

Aus dem
Hertie-Zentrum für Neurologie
Hertie-Institut für klinische Hirnforschung
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre
Erkrankungen

**Perizyten im Glioblastom: Wie beeinflussen Gliomzellen den
Differenzierungsstatus von Perizyten Glioblastom-
assoziierter Gefäße?**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Alekuzei, Abdullah

2024

Aus dem
Hertie-Zentrum für Neurologie
Hertie-Institut für klinische Hirnforschung
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre
Erkrankungen

**Perizyten im Glioblastom: Wie beeinflussen Gliomzellen den
Differenzierungsstatus von Perizyten Glioblastom-
assoziierter Gefäße?**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Alekuzei, Abdullah

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Beschorner

Tag der Disputation: 16.10.2024

Widmung

Ich widme diese Dissertationsschrift und meine Promotion meiner Familie, meiner Mutter Lina, meinen Brüdern Wais und Elias und schließlich vor allem meinem Vater, Noor A. Alekuzei, der mich in allen Lebenssituationen unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Glioblastom	1
1.1.1 Allgemein	1
1.1.2 Therapie	2
1.1.3 Klassifikation.....	2
1.1.4 Klinik.....	3
1.1.5 Tumor-Angiogenese	4
1.2 Die BBB und ihre Funktionen	5
1.2.1 Allgemein	5
1.2.2 Perizyten als Bestandteil der BBB und ihre Funktionen	6
1.2.3 Perizyten und ihre Rolle im GBM.....	7
1.3 Das mikrozelluläre Milieu des GBM.....	8
1.3.1 EMT, verschiedene EMT-Faktoren und TGF- β	8
1.3.2 TGF- β und die verschiedenen EMT-Faktoren	9
1.4 Stammzell- und Differenzierungsmarker verschiedenen Zelltyps	11
1.4.1 Perizytäre Marker	11
1.4.2 Stammzellmarker.....	14
1.4.3 Endotheliale bzw. Angiogene Marker	17
1.5 Zusammenfassende Fragestellung.....	20
2 Material und Methoden	22
2.0 Geräteliste.....	22

2.1	Materialliste	23
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.2	Chemikalien, Medien, Reagenzien, Zelllinien	24
2.1.3	Verwendete Software	25
2.2	Primer	25
2.3	Methoden	27
2.3.1	Zellkultivierung	27
2.3.2	Auszählung von Zellen	28
2.3.3	Zellbehandlung	28
2.3.4	RNA-Isolation	30
2.3.5	cDNA-Synthese	30
2.3.6	qPCR	31
2.3.7	Auswertung der qPCR-Ergebnisse	34
2.3.8	Statistische Analyse der ausgewerteten qPCR-Ergebnisse	35
3	Ergebnisse	37
3.0	Generelle Probleme in der Datenerhebung	37
3.1	Der Einfluss von TGF- β 1 bzw. TGF- β 2 auf die untersuchten Differenzierungsmarker	37
3.1.1	Nicht exprimierte Marker	37
3.1.2	Exprimierte Marker und ihre Veränderungen infolge der Behandlung	51
4	Diskussion	69
4.0	Limitationen des Studiendesigns	70
4.1	Keine Dedifferenzierung der HBVPs und keine EMT durch alleinige Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2	71
4.1.1	Keine Dedifferenzierung der TGF- β -behandelten Perizyten bei fehlender Herabregulation perizytärer Zellmarker	71

4.1.2	TGF- β -induzierte, perizytäre EMT möglicherweise nur bei bestimmtem Expressionsmuster, einschließlich bestimmter Isoformen von CSPG4/NG2	72
4.1.3	Keine Annahme von Stammzeleigenschaften der TGF- β -behandelten Perizyten bei fehlender Hochregulation der Stammzellmarker	74
4.1.4	TGF- β -induzierte Senkung der Proliferationsrate und Hemmung der tumorfördernden Mikroumwelt durch Herabregulation von c-myc und Klf4	74
4.1.5	Keine Transdifferenzierung der Perizyten in endotheliale Zelltypen bei fehlender Hochregulation endothelialer Zellmarker	75
4.1.6	Hemmung der Einwanderung von Leukozyten ins Tumorgeschehen durch TGF- β - induzierte Herabregulation von VCAM-1	77
4.1.7	Zusammengefasst keine Dedifferenzierung und Transdifferenzierung der Perizyten durch alleinige Behandlung mit TGF- β	78
4.2	Weitere Voraussetzungen für perizytäre EMT notwendig	79
4.2.1	Synergistische Interaktionen mit TGF- β zur Induktion einer EMT	80
4.3	Schlussfolgerung	85
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	88
7	Erklärung zum Eigenanteil	99
	Danksagung	100

Tabellen-, Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Exemplarische Planung einer Zellkultur	29
Tab. 2: Exemplarische Planung einer qPCR-96er-Well-Platte	31
Tab. 3: Exemplarische Durchführung eines qPCR-Versuchs	34
Tab. 4: Auswertung der qPCR mittels Excel	35

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Mittlere Expression von Sox2 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	39
Abb. 2: Mittlere Expression von Sox2 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	40
Abb. 3: Mittlere Expression von Endoglin relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	45
Abb. 4: Mittlere Expression von Endoglin relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	46
Abb. 5: Mittlere Expression von flk-1 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	48
Abb. 6: Mittlere Expression von flk-1 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	50
Abb. 7: Mittlere Expression von PDGFR- β relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	53
Abb. 8: Mittlere Expression von PDGFR- β relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	54
Abb. 9: Mittlere Expression von CSPG4 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	56

Abb. 10: Mittlere Expression von CSPG4 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	57
Abb. 11: Mittlere Expression von CD146 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	58
Abb. 12: Mittlere Expression von CD146 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	59
Abb. 13: Mittlere Expression von c-myc relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	61
Abb. 14: Mittlere Expression von c-myc relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	62
Abb. 15: Mittlere Expression von Klf4 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	64
Abb. 16: Mittlere Expression von Klf4 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	65
Abb. 17: Mittlere Expression von VCAM-1 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1	67
Abb. 18: Mittlere Expression von VCAM-1 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2	68

Abkürzungsverzeichnis

<i>BBB</i>	<i>Blut-Hirn-Schranke</i>
<i>CD146</i>	<i>Cluster of differentiation 146</i>
<i>CD31</i>	<i>Cluster of differentiation 31</i>
<i>CDH5</i>	<i>Cadherin 5</i>
<i>cDNA</i>	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
<i>CSPG4</i>	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan-4</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<i>dNTP</i>	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>

<i>EGFR</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<i>EMT</i>	<i>Epithelial-Mesenchymale Transition</i>
<i>FBS</i>	<i>Fetal bovine serum</i>
<i>FCS</i>	<i>Fetales Kälberserum</i>
<i>FGF2</i>	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
<i>Flk-1</i>	<i>Fetal-liver-kinase-1</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>
<i>GBM</i>	<i>Glioblastom</i>
<i>HBVPs</i>	<i>Human Brain Vascular Pericytes</i>
<i>HIF-1</i>	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
<i>HIF-1α</i>	<i>Hypoxia-inducible factor-1α</i>
<i>HIF-1β</i>	<i>Hypoxia-inducible factor-1β</i>
<i>IDH</i>	<i>Isocitrat-Dehydrogenase</i>
<i>IL-2</i>	<i>Interleukin-2</i>
<i>Klf4</i>	<i>Kruppel-like factor 4</i>
<i>LIF</i>	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
<i>Mfsd2a</i>	<i>Major facilitator superfamily domain containing 2a</i>
<i>MMP-9</i>	<i>Matrix-Metalloproteinase 9</i>
<i>NG2</i>	<i>Nerve/Glial antigen 2</i>
<i>Oct4</i>	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
<i>P/S</i>	<i>Penicillin / Streptomycin</i>
<i>PBS</i>	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
<i>PDGF-B</i>	<i>Platelet-derived growth factor subunit B</i>
<i>PDGFR-β</i>	<i>Platelet-derived growth factor receptor β</i>
<i>PECAM-1</i>	<i>Platelet / endothelial cell adhesion molecule-1</i>
<i>PGS</i>	<i>Pericyte growth supplement</i>
<i>PNS</i>	<i>Peripheres Nervensystem</i>
<i>RAS</i>	<i>rat sarcoma</i>
<i>RGS5</i>	<i>Regulator of G-Protein signaling 5</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic acid</i>
<i>SMAD</i>	<i>Suppressor of mother against decapentaplegic</i>
<i>Sox10</i>	<i>Sex determining region Y-box transcription factor 10</i>
<i>Sox17</i>	<i>Sex determining region Y-box transcription factor 17</i>
<i>Sox2</i>	<i>Sex determining region Y-box transcription factor 2</i>

SPARC.....*secreted protein acidic and rich in cysteine*
TERT..... *Telomerase reverse transcriptase*
TGF- β *Transforming growth factor- β*
TM..... *Thrombomodulin*
VCAM-1 *Vascular cell adhesion protein 1*
VE-Cadherin..... *Vascular Endothelial Cadherin*
VEGF..... *Vascular endothelial growth factor*
WNT..... *Wingless / Integrated*
 α -SMA..... *α -smooth muscle actin*

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

1.1.1 Allgemein

Gliome gehören zu den häufigsten malignen ZNS-Tumoren. Sie entstehen aus Gliazellen und ihren Vorläuferzellen (1). Die aktuelle Klassifikation der WHO teilt Gliome in Grad 1 bis 4 ein und zieht hierfür neben histologischen und immunhistochemischen auch molekulare Diagnosekriterien hinzu (2). Grad-1 Gliome zeichnen sich durch einen wenig proliferativen Charakter aus und lassen sich chirurgisch kurabel behandeln. Gliome des Grads-2 weisen ebenso geringgradig proliferative Eigenschaften auf, wachsen allerdings infiltrativ und neigen dazu, zu rezidivieren. Gliome ab Grad-3 weisen histopathologisch u.a. Kernatypien als Hinweis auf höhergradige Malignität auf. So sind Grad-4 Gliome hochgradig proliferativ, können Nekrosen aufweisen und haben eine weitaus schlechtere Prognose (3). Zu den Grad-4 Gliomen gehört u.a. das Glioblastom (GBM), das stark proliferiert, infiltrativ wächst und neben Nekroseherden ein hohes Maß an Vaskularisation aufweist (2, 4). Wegen seines histopathologisch facettenreichen Erscheinungsbildes wurde dem GBM ehemals der Name Glioblastoma multiforme zuteil (5).

Das GBM ist der häufigste maligne Tumor des Hirns/ZNS mit einem Anteil von 14,3% an allen Hirn-/ZNS-Tumoren und 49,1% an den malignen Hirn-/ZNS-Tumoren in den USA, in denen die Inzidenz bei ca. 3,23 pro 100.000 Einwohnern liegt und mit dem Alter zunimmt (1). In Europa beträgt die Inzidenz ca. 3,55 pro 100.000 Einwohner und ist somit ähnlich (6). Das GBM tritt bei Männern in den USA 1,6-mal und in Europa 1,34-mal häufiger auf als bei Frauen (1, 6). Das mittlere Alter der GBM-Patientinnen und -Patienten lag bei ca. 61,3 +/- 14,0 Jahren (6).

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 6,8% ist die Prognose des GBM insgesamt schlecht (1). Die Zwei-Jahres-Überlebensrate kann von 10,4% bei alleiniger Bestrahlungstherapie auf 26,5% bei zusätzlicher Behandlung mit Temozolomid verbessert werden (7).

1.1.2 Therapie

Wie die meisten Tumore im ZNS wird auch das GBM in erster Linie operativ durch radikale Resektion behandelt, wobei neben Reduktion der Tumormasse hier zudem die histologische Diagnose und Genotypisierung des Tumors im Vordergrund stehen (8). Eine operative Resektion, die radikal statt schonend erfolgt, verbessert die Prognose (9). Anschließend folgt in der Regel eine kombinierte Radiochemotherapie, bestehend aus einer Strahlentherapie mit insgesamt 60 Gy und gleichzeitiger Temozolomid-Behandlung nach dem Schema von Stupp et al. (7). Im Anschluss an eine Standarderhaltungstherapie mit Temozolomid kann ein Einsatz von Tumortheraiefeldern erwogen werden, der das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben weiter verlängert (10).

1.1.3 Klassifikation

Die Klassifikation des GBM orientierte sich ehemals nach der alten WHO-Klassifikation von 2016. Diese zog hierfür den Mutationsstatus der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) heran. Demnach wurde das GBM in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe umfasste die GBM mit einem IDH-Wildtyp-Status, während die zweite Gruppe diejenigen mit mutiertem IDH-Status zusammenfasste. Die dritte Gruppe bildeten die GBM, bei denen die Sequenzierung des IDH-Status nicht möglich war (11). Die Einteilung nach dem Zeitpunkt der klinischen Erstdiagnose entsprach dabei weitläufig der Klassifikation nach dem IDH-Status, wonach die GBM der mehrheitlich vorkommenden Gruppe mit IDH-Wildtyp-Status zumeist den primären GBM zugeordnet wurden und die GBM der Gruppe mit IDH-Mutationsstatus überwiegend den sekundären GBM zugerechnet wurden. Dabei stellte das primäre GBM eine Erstdiagnose ohne Vorbefunde dar, das demzufolge als neu entstandenes de-novo-GBM bezeichnet wurde. Im Gegensatz dazu ging man ehemals beim sekundären GBM davon aus, dass es sich über Jahre hinweg aus niedrig-gradigen Gliomen des WHO-Grads 2 bzw. 3 entwickelt hätte (11, 12).

Die alte Klassifikation von 2016, die noch in der Gruppe der diffusen Gliome des Erwachsenentyps 15 verschiedene Entitäten unterschied (2, 11), wurde durch die aktuelle WHO-Klassifikation von 2021 ersetzt, die ein neues Einteilungssystem einführte, das histopathologische Gesichtspunkte mit genetischen Veränderungen kombiniert. Das neue Einteilungssystem für diffuse, astrozytäre Gliome des Erwachsenentyps umfasst das

IDH-mutierte Astrozytom, das IDH-mutierte sowie 1p/19q-codeletierte Oligodendrogliom und das GBM mit IDH-Wildtyp-Status (2). Das ehemals nach der WHO-Klassifikation von 2016 bezeichnete GBM mit IDH-Mutationsstatus, das klinisch zumeist den sekundären GBM zugeordnet wurde (11), wurde in der aktuellen Klassifikation von 2021 durch das Astrozytom mit IDH-Mutationsstatus ersetzt (2). Außerdem umfassen die aktuellen, erneuerten Diagnosekriterien des GBM mit IDH-Wildtyp-Status histologisch nachweisbare Nekrosen, mikrovaskuläre Proliferationen, die Chromosomenveränderung +7/-10 bzw. die Kombination eines zusätzlichen kompletten Chromosoms 7 mit dem Verlust eines vollen Chromosoms 10 (2), die Amplifikation des Epidermal growth factor receptor (EGFR) bzw. die EGFR-Genamplifikation und die Mutation des Telomerase reverse transcriptase (TERT-) Promoters bzw. die TERT-Promoter-Mutation (2, 13-15), wobei der EGFR einen Transmembran-Rezeptor (16, 17) und die TERT die katalytische Untereinheit des Enzyms Telomerase darstellt (18). Sobald mindestens eines dieser genannten Diagnosekriterien bei einem vorliegenden diffusen und astrozytären Gliom mit IDH-Wildtyp-Status eines/einer Erwachsenen zutrifft, kann die Diagnose eines GBM vom IDH-Wildtyp gestellt werden, da die Diagnosestellung nach neuer WHO-Klassifikation nicht mehr ausschließlich vom histologischen Befund abhängt (2, 15). Im Zusammenhang mit pädiatrischen Hirntumoren, die in eine eigene Gruppe mit weiteren, teils anderen Diagnosekriterien eingeteilt wurden, wird der Begriff GBM nach neuer Klassifikation von 2021 aktuell nicht mehr verwendet (2).

1.1.4 Klinik

Die Symptomatik hängt u.a. von der Lokalisation des GBM ab und ist entsprechend variabel. Abhängig von der Lokalisation können einseitige, streng lokalisierte Kopfschmerzen, Persönlichkeitsveränderungen, Motorik- und/oder Sensibilitätsstörungen sowie Beeinträchtigungen der Sprachmotorik und -Koordination bis hin zu Inkontinenz und Gangunsicherheit auftreten. Der intrakranielle Druck erhöht sich und führt zu Übelkeit und Erbrechen. Dieser kann bei der Untersuchung durch ein Papillenödem auffallen (5).

1.1.5 Tumor-Angiogenese

Eine ausgeprägte Tumor-Angiogenese ist ebenfalls ein Merkmal und Diagnosekriterium des GBM (2, 4, 19). Die Angiogenese ist ein Prozess, bei dem aus bereits existierenden Gefäßen neue Gefäßäste wachsen und so neue, versorgende Gefäße entstehen lassen (20). Nach dem Abbau der Basalmembran migrieren und proliferieren Endothelzellen, um neue Gefäße zu bilden (21). Unter physiologischen Umständen wird dieser Prozess streng reguliert und läuft intermittierend ab, bspw. zur Wundheilung. Die unkontrollierte Angiogenese dagegen hängt mit pathologischen Prozessen zusammen (22). So sind aufgrund des erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarfs wachsende Tumore ab einer bestimmten Größe auf eine erhöhte Vaskularisation angewiesen (22, 23). Dies erreicht der Tumor, indem er das Gleichgewicht zwischen Angiogenese-Inhibitoren und -Initiatoren, das normalerweise aufseiten der Inhibitoren liegt, zugunsten der Initiatoren verschiebt. Die erhöhte Freisetzung angiogener Faktoren gegenüber Angiogenese-Inhibitoren führt infolgedessen zum sogenannten „angiogenic switch“, der daraufhin die Tumor-Angiogenese auslöst (20, 24-27).

Die Tumorzellen des GBM weisen ein sehr hohes Maß an Proliferation auf (28). Dies führt zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf. Aufgrund der entstehenden hypoxischen Umweltbedingungen migrieren die Tumorzellen von der hypoxischen Zone weg. Dabei hinterlassen sie die charakteristischen, streifenförmigen Nekroseherde und es bilden sich die sogenannten „Pseudopalisaden“. Währenddessen sezernieren die hypoxischen Tumorzellen angiogene Faktoren, die zu mikrovaskulären Proliferationen führen. Die hypoxischen Tumorzellen migrieren daraufhin in Richtung der neu entstehenden Tumorgefäße. Solche hypoxischen Verhältnisse können neben erhöhtem Sauerstoffbedarf des Tumors auch durch Gefäßverschlüsse und Thrombosen verursacht werden, die im GBM häufig vorkommen (29, 30). Histologische Untersuchungen von über hundert zufällig ausgewählten Proben ergaben, dass das GBM in über 90% der Fälle vaskuläre Thrombosen aufweist. Dabei zeigten sich Pseudopalisaden größenabhängig vaskularisiert. Die nachgewiesenen Gefäße wiesen dabei morphologisch-pathologische Veränderungen auf, waren verzerrt oder thrombosiert und machten teilweise einen funktionsunfähigen Eindruck (31). Dabei ist das thromboembolische Risiko für Hirntumore besonders hoch und bleibt bei höhergradigen Gliomen selbst zwei Jahre nach chirurgischer Resektion weiterhin erhöht (32,

33). Hypoxie stellt somit eine der Hauptursachen der Tumor-Angiogenese im GBM dar und kommt, wie die Bildgebung zeigt, im GBM regelhaft vor (30, 34).

Verschiedene Risikofaktoren beim GBM tragen zur Entstehung vaskulärer Thrombosen bei. Dazu gehören u.a. der veränderte Blutfluss in den dysmorphen Gefäßen des Tumors, eine Dysregulation der pro- und antithrombotischen Faktoren und das auftretende Hirn-ödem (29). Das auftretende Hirnödem impliziert dabei einen Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke (BBB), der sich wegen der erhöhten Permeabilität der BBB in der Bildgebung als ringförmiges Kontrastmittel-Enhancement äußert (29, 35, 36). Dabei ermöglicht die MR-Bildgebung die Messung der erhöhten endothelialen Permeabilität der BBB (35). Die pathologischen Veränderungen der BBB, wie dysplastische Endothelzellen mit vermehrten intrazellulären Vesikeln, ausgedünnter Basalmembran und abgelösten Perizyten, lassen sich mikroskopisch beobachten und bestätigen (29, 37).

Zusammenfassend ist die BBB im GBM hochgradigen Funktionsstörungen ausgesetzt. Eine funktionsgestörte BBB gehört zu den pathologischen Merkmalen des GBM. Um ihre Rolle im GBM zu verstehen, wird im Folgenden der zelluläre Aufbau und der funktionelle Beitrag der BBB zum ZNS erläutert.

1.2 Die BBB und ihre Funktionen

1.2.1 Allgemein

Der Begriff „Blut-Hirn-Schranke“ entstand aus der Beobachtung, dass die Gefäße im Hirn eine besonders geringe Permeabilität aufweisen. Dabei setzt sie sich aus mehreren Bestandteilen zusammen. Die Gefäßwand besteht aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten. Das Hirnparenchym beherbergt die Astrozyten als weiteren zellulären Bestandteil der BBB und wird von der Gefäßwand durch den perivaskulären Raum getrennt (38).

Die BBB hat mehrere spezifische Eigenschaften. Zum einen sind die Endothelzellen des ZNS über besonders enge Tight-Junctions miteinander verbunden, die die parazelluläre Diffusion von Molekülen von der Blutbahn ins Hirnparenchym verhindern (39, 40). Außerdem exprimieren sie eine Vielzahl spezifischer Transportproteine und zeichnen sich durch geringe Transzytose-Raten aus. Dadurch sorgen sie für eine strenge Regulierung

des molekularen Transports zwischen Blut und Hirnparenchym. Zuletzt regulieren die Endothelzellen des ZNS die Immunüberwachung, indem sie die Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen, die für den Eintritt der Leukozyten ins Hirnparenchym notwendig sind, herabregulieren. Die BBB hält durch diese Eigenschaften die Funktionen des ZNS aufrecht (39).

Trotzdem sind die Funktionen des BBB weniger eine Eigenleistung der Endothelzellen, sondern vielmehr das Ergebnis zwischenzellulärer Interaktionen des Endothels mit verschiedenen Zellen der Umgebung. Zu diesen wichtigen Zellen, die die Entwicklung und Funktionen der BBB unterstützen, gehören die Perizyten (41, 42).

1.2.2 Perizyten als Bestandteil der BBB und ihre Funktionen

Perizyten sind perivaskulär gelegene Zellen, die die Blutgefäße umhüllen und in engem Kontakt zu den Endothelzellen stehen. Sie gehören u.a. neben Endothelzellen und Astrozyten zur sog. „Neurovaskulären Einheit“, die eine Vielzahl an Aufgaben zur Aufrechterhaltung der BBB und der neuronalen Funktionen des Gehirns erfüllt. Im ZNS liegen die Perizyten zwischen den Endothelzellen der Gefäße und den Astrozyten des Hirnparenchyms (39, 43). Sie weisen im Vergleich zur Peripherie v.a. in der Retina und um Hirnkapillaren eine besonders hohe Dichte bzw. einen hohen Bedeckungsgrad auf (44). Dabei ist die Permeabilität der BBB umso geringer, je höher der Bedeckungsgrad der Hirngefäße durch die Perizyten ist (41, 42).

Perizyten beeinflussen die Genexpression in den Endothelzellen des ZNS. Bei einem Mangel an Perizyten ist die Expression permeabilitätssteigernder Gene in Endothelzellen erhöht. Außerdem senken Perizyten in Endothelzellen des ZNS die Expression verschiedener Leukozyten-Adhäsionsmoleküle. Dadurch regulieren Perizyten neben der Permeabilität der BBB auch die Immunüberwachung des ZNS und gewährleisten ihre Integrität. Außerdem stabilisieren Perizyten die Funktionsfähigkeit der Tight-Junctions zwischen den ZNS-Endothelzellen und regulieren zudem die korrekte Anordnung der Astrozyten an die Gefäße, da bei Abwesenheit der Perizyten weder funktionsfähige Tight-Junctions noch eine ordnungsgemäße Anhaftung der Astrozyten an die Gefäße vorgefunden werden konnte (41, 42). Daneben tragen Perizyten zur Regulation der Transzytose durch ZNS-Endothelzellen bei. Ein Perizyten-Mangel führt zur Erhöhung der Transzytose und somit

der Permeabilität der BBB. Dies geschieht zumindest teilweise durch das Membran-Transportprotein des Gens namens Major facilitator superfamily domain containing 2a (Mfsd2a). Mfsd2a reguliert die Transzytose in ZNS-Endothelzellen und wird bei Perizyten-Mangel von diesen vermindert exprimiert, wodurch sich die Transzytose-Rate erhöht (41, 42, 45).

Unter hypoxischen Bedingungen können Perizyten den Charakter multipotenter Stammzellen annehmen und unter bestimmten Bedingungen zu Zellen vaskulären und neuralen Zelltyps umprogrammiert werden. Dabei kann die Umprogrammierung der Perizyten u.a. zu Endothelzellen, unreifen Neuronen, verschiedenen Gliazellen oder Mikroglia-Zellen mit Phagozytose-Eigenschaften erfolgen. Dies geschieht unter Hochregulation verschiedener Differenzierungs- und Stammzellmarkern, wie z.B. Sox2 und Klf4. Damit haben hypoxische Hirn-Perizyten das Potenzial, bei Bedarf, beispielsweise während regenerativer Prozesse, Teile der BBB zu produzieren (46, 47).

1.2.3 Perizyten und ihre Rolle im GBM

Perizyten spielen aufgrund ihrer vielseitigen Fähigkeiten bei der Karzinogenese des GBM und seiner Malignität eine große Rolle. GBM-Zellen verändern und desorganisieren die Kontraktilität der Perizyten zu ihren Gunsten. Teilweise bilden sie durch Verschmelzung mit Perizyten neuartige, hybrid-ähnliche Zellen, die am Rande des Tumors liegen. Diese Hybrid-Zellen sind assoziiert mit abnorm dilatierten sowie verengten Gefäßen und hypoxischen Umweltbedingungen (48).

Des Weiteren kann das GBM Perizyten in weitläufigen, gesunden, auch kontralateral gelegenen Teilen des Gehirns aktivieren und rekrutieren, sodass diese zur Penumbra am Randgebiet in Angrenzung zum Tumor migrieren, wo hypoxische Verhältnisse vorherrschen. Studien zufolge kommen aktivierte, rekrutierte Hirn-Perizyten am hypoxischen Randgebiet in hoher Zahl vor und stellen dort den Großteil der gefäßbedeckenden Perizyten im Tumor-Gefäßbett (49).

Außerdem entfalten Gliom-assoziierte Perizyten im GBM eine immunsuppressive Wirkung, indem sie immunsupprimierende Zytokine, u.a. den Transforming growth factor- β (TGF- β), sezernieren und dadurch immunsuppressiv und antiproliferativ auf Leukozyten und T-Lymphozyten wirken. Gliom-assoziierte Perizyten korrelieren mit dem

Malignitätsgrad der Gliome. Sie kommen in besonders hoher Zahl im GBM vor und in niedrigerer Zahl in Gliomen niedrigeren Grades. Gleichzeitig kommen einwandernde Leukozyten, u.a. CD8-positive T-Zellen, im GBM in geringerer Zahl vor, was auf die immunsuppressive Funktionen der Gliom-assoziierten Perizyten hinweist (50).

Aufgrund ihrer besonderen Rolle innerhalb der BBB stellt sich die Frage, inwieweit Perizyten zur Tumorgenese des GBM weiter beitragen. Um die beteiligten Vorgänge und Zytokine zu verstehen, werden im Folgenden die biochemischen Vorgänge sowie Zytokine erklärt, die für die Forschungsfrage relevant sind.

1.3 Das mikrozelluläre Milieu des GBM

1.3.1 EMT, verschiedene EMT-Faktoren und TGF- β

Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen eine Umprogrammierung zum mesenchymalen Zelltyp durchlaufen. Dabei verlieren sie ihre Haftung an die Basalmembran zugunsten erhöhter Migrationsfähigkeit und Apoptose-Resistenz. Die EMT wird in drei Kategorien unterteilt. Die EMT-Typ I tritt während der frühen Entwicklungsphasen der Embryogenese auf und erzeugt mesenchymale Zellen für die weitere Entwicklung. Sie ist u.a. an der Organogenese beteiligt. Die EMT-Typ II läuft während der Gewebereparatur und Wundheilung in sekundären Epithel- oder Endothelzellen ab. Infolge entzündlicher Vorgänge wandeln sich diese Zellen zur Unterstützung der Reparaturprozesse im betroffenen Gewebe in Fibroblasten um. Bei chronischen Entzündungen können dadurch allerdings Fibrosierungen des betroffenen Organs die Folge sein. Die EMT Typ III kommt im Zusammenhang mit neoplastischen Zellen vor, die dadurch die Fähigkeit zur Metastasierung erwerben und ihre Invasivität erhöhen (51-53).

Eine solche EMT kann im Tumor, wie bspw. im GBM, durch hypoxische Verhältnisse, die regelhaft im GBM vorkommen (30, 34), induziert werden (51). Dabei dient der sog. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) als Transkriptionsfaktor und reguliert in Abhängigkeit der Sauerstoffverhältnisse die Transkription verschiedener Gene. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), ist neben dem Hypoxia-inducible factor-1 β (HIF-1 β) eine Untereinheit von HIF-1 und kumuliert unter hypoxischen Umweltbedingungen, da sein Abbau sauerstoffabhängig erfolgt. Deshalb wird es bei Hypoxie vermindert abgebaut. Die

Akkumulation von HIF-1 α aktiviert dadurch die Transkription von HIF-1 α - und HIF-1-spezifischen Ziel-Genen (54, 55). Dabei führt HIF-1 α u.a. zur Rekrutierung verschiedener myeloider Zellen, Tumor-assoziiierter Makrophagen sowie endothelialer und perizytärer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Die rekrutierten myeloiden Zellen, u.a. Tumor-assoziierte Makrophagen, erhöhen durch Expression und Sekretion von Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) die Bioverfügbarkeit von Vascular endothelial growth factor (VEGF) und fördern dadurch die Tumor-Angiogenese im GBM, die zu den pathologisch veränderten Gefäßmustern führt (56), wobei MMP-9 ein Zink-abhängiges Enzym mit der Fähigkeit zum Abbau der Bestandteile der extrazellulären Matrix (57) und VEGF einen angiogenen Faktor darstellt (58). Diese Tumor-assoziierten Makrophagen sezernieren im Gliom bzw. GBM am invasiven Ausbreitungsgebiet große Mengen an TGF- β 1, ein Zytokin, welches die Invasivität des Tumors erhöht (59). TGF- β kann in Zellen unter bestimmten Umständen, u.a. abhängig vom Zellzyklus, eine EMT auslösen (60, 61). Die hypoxische Mikroumwelt, die hohe Mengen an TGF- β aufweist, kann dadurch im Gliom bzw. im GBM Prozesse der EMT induzieren (51).

Nachdem die Bedeutung der EMT in Bezug auf die Tumorgenese erläutert wurde, stellt sich nun die Frage, wie die EMT in verschiedenen Zellen induziert und reguliert wird. Deshalb werden im folgenden Kapitel solche EMT-Faktoren sowie die TGF- β -Familie vorgestellt.

1.3.2 TGF- β und die verschiedenen EMT-Faktoren

Die TGF- β -Familie ist eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die diverse Funktionen, u.a. im Hinblick auf Proliferation, Differenzierung, Motilität und Apoptose, erfüllt (62). Zu dieser Gruppe gehört der TGF- β , wovon es die drei Isoformen TGF- β 1 bis TGF- β 3 gibt und eine eigene Untergruppe bilden (63). TGF- β induziert die Genexpression seiner Ziel-Gene, indem es im ersten Schritt an seinen spezifischen Rezeptor bindet. Dabei handelt es sich um einen Serin-Threonin-Kinase-Rezeptorkomplex aus zwei einzelnen Transmembran-Rezeptoren, Typ I und Typ II, mit einer intrazellulären Serin-Threonin-Domäne. Infolge der Bindung eines Liganden dimerisieren die beiden Transmembran-Rezeptoreinheiten. Dies löst eine Phosphorylierung der Rezeptor-Untereinheit Typ I durch Typ II aus, woraufhin intrazellulär bestimmte, signalspezifische Proteine phosphoryliert

werden (64). Bei diesen Proteinen handelt es sich um die sog. Suppressor of mother against decapentaplegic (SMAD-) Proteinfamilie (65). Diese bilden infolge der Phosphorylierung einen Komplex aus verschiedenen SMAD-Proteinen, der zum Nukleus wandert. Dort bindet er an andere Transkriptionsfaktoren und bildet einen Transkriptionskomplex, der an die jeweiligen Ziel-Gene bindet und ihre Expression entweder hochreguliert oder abschwächt (64).

Die immunsupprimierende Wirkung gehört zu den wichtigsten Funktionen von TGF- β und spielt in der Mikroumwelt des GBM für seine Malignität eine große Rolle (66-68). So wirkt TGF- β 2 durch Induktion von Apoptose in verschiedenen T-Lymphozyten-Zelllinien immunsuppressiv und antiproliferativ (69). Dieselbe Wirkung hat TGF- β auch auf körpereigene T-Lymphozyten (67). TGF- β hemmt außerdem die Differenzierung naiver CD4-positiver T-Lymphozyten zu Th2-Lymphozyten (70, 71) und unter bestimmten Umständen auch zu Th1-Lymphozyten, bspw. abhängig von der Konzentration von Interleukin-2 (IL-2) (72, 73). Zudem hemmt TGF- β in Lymphozyten-Mischkulturen dosisabhängig die Differenzierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten (74). An der BBB wirkt TGF- β 2 hemmend auf die Migration von Leukozyten ins ZNS und reduziert dadurch seine Immunüberwachung (75). Insgesamt bewirkt TGF- β durch verschiedene Mechanismen eine Hemmung der Immunantwort gegen den Tumor (66).

Im GBM kommen in den meisten Fällen TGF- β 1 und - β 2 in hoher Konzentration vor. Dabei sezernieren verschiedene GBM-Zelllinien höhere Mengen beider TGF- β -Isoformen. Eine höhere Expression dieser hängt dabei signifikant mit höherer Malignität zusammen (76).

Zudem findet sich im GBM eine hohe Expression der EMT-Regulatoren namens SLUG und TWIST in Tumor-assoziierten Perizyten vor, wohingegen deren Expression in GBM-Zellen kontrovers diskutiert wird. In einer breit angelegten Studie untersuchten Mäder et al. Proben verschiedener Gliome vom WHO-Grad 1 bis 4. Dabei konnten sie die Hochregulation der EMT-Regulatoren SLUG und TWIST in Perizyten bzw. Gefäßwandzellen der Tumorgefäßproliferationen angiogener Hirntumore vom WHO-Grad 1 und 4 nachweisen. Diese angiogenen Hirntumore umfassten das pilozytische Astrozytom, WHO-Grad 1, und den von Mäder et al. als sekundäres GBM mit IDH-Mutationsstatus, WHO-Grad 4, eingestuften Hirntumor. Im kaum angiogenen Grad-2- und Grad-3-Gliom war

dagegen keine Hochregulation von SLUG und TWIST nachweisbar. Daher hängt die Expression von SLUG und TWIST signifikant mit der Tumor-Angiogenese in angiogenen Gliomen zusammen (77). Sowohl TGF- β 1 als auch - β 2 erhöhen dabei die Expression des EMT-Regulators SLUG in Human Brain Vascular Pericytes (HBVPs). Die TGF- β -induzierte SLUG-Expression führt in Perizyten neben einer Erhöhung ihrer Migration und Proliferation zu sichtbaren, morphologischen Veränderungen. Dies deutet darauf hin, dass GBM-Zellen benachbarte Perizyten durch Sekretion von TGF- β modulieren und verändern und so letztlich die Tumor-Angiogenese beeinflussen. Dies könnte eine der Ursachen für die pathologisch deformierte Vaskularisation des GBM sein (78).

Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob Tumor-assoziierte Perizyten durch GBM-sezerniertes TGF- β dedifferenzieren und Stammzeleigenschaften erwerben und ob sie ggf. anschließend im Rahmen einer EMT auch eine Transdifferenzierung in endotheliale bzw. vaskuläre Zelltypen durchlaufen und möglicherweise so zur Tumor-Angiogenese beitragen.

Um dies herauszufinden, wurden in der vorliegenden Arbeit TGF- β -behandelte Perizyten auf Hochregulation bestimmter Marker-Gene untersucht, die in Perizyten, Stammzellen und in endothelialen bzw. vaskulären Zelltypen oder aktivierten Endothelzellen exprimiert werden. Im Folgenden werden die untersuchten Marker-Gene der vorliegenden Arbeit vorgestellt.

1.4 Stammzell- und Differenzierungsmarker verschiedenen Zelltyps

1.4.1 Perizytäre Marker

1.4.1.1 Platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR- β)

PDGFR- β ist ein Rezeptor, der von Perizyten und deren Vorläuferzellen exprimiert wird und mit dem Protein Platelet-derived growth factor subunit B (PDGF-B) an der PDGF-B / PDGFR- β -Signalachse teilnimmt. Diese ist für die Rekrutierung von Perizyten bzw. perizytären Vorläuferzellen an die perivaskuläre Anhaftungsstelle sich entwickelnder Gefäße zuständig. Dabei kommt es zur Migration der Perizyten-Vorläuferzellen zu den entwickelnden Gefäßen und zur Proliferation dieser Zellen. Ein Knockout dieses Signalwegs hat eine fehlende Perizyten-Bedeckung betroffener Gefäße zur Folge und bei flächendeckendem Knockout sogar sämtlicher Gefäße. Betroffen sind u.a. das Hirn, die Lunge und

das Herz. Klinisch führt dies bereits perinatal bei steigendem Blutdruck u.a. zu Hämorrhagien, Ödeme und Mikroaneurysmen (79, 80).

Im GBM findet sich selektiv ein Nachweis hochregulierter Expression von PDGFR- β in Perizyten mikrovaskulärer Proliferationen. Normale Blutgefäße im Hirn zeigen dagegen keine Expression (81).

1.4.1.2 Chondroitin sulfate proteoglycan-4 (CSPG4)

CSPG4 ist ein Transmembran-Glykoprotein, das u.a. in Perizyten exprimiert wird und unter verschiedenen Namen bekannt ist. Dabei ist nerve/glial antigen 2 (NG2) der Name von CSPG4 (82).

Das Proteoglykan CSPG4 wird in aktivierten Perizyten exprimiert, die mit Neovaskularisation und Angiogenese bzw. mit sich bildenden Gefäßen assoziiert sind. CSPG4 wird aber auch in anderen Zelltypen exprimiert, u.a. in Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen während der embryologischen Entwicklung. Eine besonders starke Hochregulation von NG2 findet sich daher v.a. in Perizyten vaskulärer Proliferationen von Gewebeproben mit besonders ausgeprägter Angiogenese, wie von Hirntumoren und der Plazenta, sowie der neubildenden Gefäße der embryologischen Entwicklung (83, 84). Darüber hinaus wird NG2 auch von Vorläuferzellen von Oligodendrozyten und myeloiden Zellen wie Makrophagen exprimiert (85, 86).

CSPG4 wird in proliferativ aktiven Perizyten im Rahmen physiologischer Angiogenese und Tumor-Angiogenese exprimiert. In Perizyten ruhender, nicht-proliferierender Gefäße findet keine Expression statt. Dies trifft sowohl auf normale Gefäße als auch auf Tumorgefäße niedrig- und hochgradiger Gliome zu (87-90).

1.4.1.3 Regulator of G-Protein signaling 5 (RGS5)

RGS5 ist ein Protein, das unter verschiedenen Umständen in Zusammenhang mit Angiogenese in Perizyten exprimiert und hochreguliert wird, u.a. bei der physiologischen Wundheilung sowie bei der Tumor-Angiogenese. Die Expression und Hochregulation von RGS5 korreliert dabei mit dem sog. „angiogenic switch“ bzw. der Induktion der Angiogenese in Tumoren wie bspw. dem Pankreasinsel-Tumor oder den stark

vaskularisierten Hirn-Tumoren (20, 26, 27, 91). Deshalb kommt es während der Tumor-Progression bei stattfindender Vaskularisation im Tumor zur Hochregulation von RGS5 in Tumor-assoziierten Perizyten. Bei physiologisch und proliferativ ruhendem, nicht-angiogenen Gefäßstatus dagegen wird die Expression von RGS5 reduziert. Bei der physiologischen Wundheilung wird RGS5 in Perizyten zum Zwecke der Vaskularisation und Wundschließung nur kurzzeitig hochreguliert. RGS5 stellt daher einen Marker für aktivierte Perizyten zum Zwecke der Angiogenese dar (91). Auch in der embryologischen Entwicklung wird RGS5 in Perizyten sowie glatten Muskelzellen sich entwickelnder Gefäße verschiedener Organe, u.a. im reifenden Gehirn, hochreguliert (92, 93). Daher kann RGS5 als Marker insbesondere für aktivierte Perizyten verwendet werden, die mit Angiogenese assoziiert sind (91-93).

1.4.1.4 Cluster of differentiation 146 (CD146)

Das Zelladhäsionsmolekül CD146 spielt während der Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Reifung der BBB. Zu Beginn der BBB-Entwicklung ist CD146 noch in ZNS-Endothelzellen unreifer Gefäße der Mikrozirkulation exprimiert, die noch nicht von Perizyten bedeckt werden. Diese Expression nimmt allerdings im Verlauf der BBB-Entwicklung ab, sodass ZNS-Endothelzellen, die durch Perizyten bedeckt werden, keine Expression von CD146 mehr aufweisen. Die Perizyten der BBB dagegen exprimieren CD146 konstitutiv. Funktionell gewährleistet CD146 die Integrität der BBB und dient den Perizyten als Ko-Rezeptor des PDGFR- β , der an der PDGF-B/PDGFR- β -Signalachse teilnimmt. Ein Knockout von CD146 in Endothelzellen führt zu einer Störung der BBB, einer Erhöhung ihrer Permeabilität und anschließend zu einem Hirnödem. Dagegen hat ein Knockout von CD146 in Perizyten eine Erhöhung der BBB-Permeabilität und eine beeinträchtigte Rekrutierung von Perizyten an die Gefäße der BBB mit konsekutiver Reduktion der Perizyten-Bedeckung zur Folge (94).

Aus den oben genannten Gründen wurden PDGFR- β , CSPG4/NG2, RGS5 und CD146 als perizytäre Zellmarker herangezogen.

1.4.2 Stammzellmarker

1.4.2.1 *Sex determining region Y-box transcription factor 2 (Sox2), Kruppel-like factor 4 (Klf4), c-myc*

Sox2, Klf4 und c-myc gehören neben octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) zu den Genen, die in verschiedenen adulten, somatischen Zellen, u.a. in Fibroblasten, eine Dedifferenzierung mit anschließender Umprogrammierung in pluripotente Stammzellen auslösen können. Dies wurde im Rahmen experimenteller Studien gezeigt, die diese Gene durch Transduktion in verschiedene murine und humane Zellen eingeschleust haben. Der induzierte Stammzellcharakter äußert sich u.a. durch Expression verschiedener Stammzellmarker und durch eine Veränderung der Morphologie, die embryonalen Stammzellen ähnelt. Die dadurch erzeugten pluripotenten Stammzellen können nach subkutaner Injektion Teratome bilden und sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren (95, 96).

Allgemein gehört Sox2 zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die sich in einer bestimmten Bindungsdomäne ähneln. Sox2 ist essenziell für die frühe, embryonale Entwicklung und spielt in zahlreichen Tumorerkrankungen eine Rolle (97). Sox2 wird in Hirn-Perizyten unter normalen Bedingungen nicht exprimiert, aber unter ischämischen Bedingungen hochreguliert (98).

Klf4 ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der auf verschiedene Gene sowohl aktivierend als auch suppressiv wirken kann. Es greift in den Zellzyklus ein und reguliert u.a. die Apoptose. Vor diesem Hintergrund kann Klf4 wie ein Tumorsuppressor oder ein Proto-Onkogen wirken und findet sich daher in verschiedenen Tumorerkrankungen entweder hoch- oder herabreguliert vor (99).

C-myc ist der Name eines Proto-Onkogens, das mithilfe von Transkriptions-Kofaktoren und mittels Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen eine Vielzahl von Genen und Funktionen hinsichtlich Apoptose, Proliferation und Differenzierung reguliert. Durch Amplifikation oder Translokation kann c-myc in ein Onkogen entarten, weshalb es bei einer Vielzahl maligner Erkrankungen eine Rolle spielt (100, 101).

Eine Expression von Klf4 und c-myc wurde jeweils sowohl in normalen als auch in ischämischen Perizyten detektiert. Hierbei war jedoch keine Regulation erkennbar (98).

1.4.2.2 Sex determining region Y-box transcription factor 10 (Sox10)

Der Transkriptionsfaktor Sox10 ist in verschiedenen Gliazellen des ZNS und des Peripheren Nervensystems (PNS), die teilweise von der Neuralleiste abstammen, exprimiert. Dazu gehören Schwann'sche Zellen, Oligodendrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Dabei weist Sox10 eine ausgeprägte Assoziation mit starker Myelinisierung auf. So findet sich eine Expression v.a. an Axonen von Motoneuronen, im enterischen NS oder in bestimmten Hirnarealen, u.a. im Corpus Callosum oder in der Capsula interna et externa. Während der embryonalen Entwicklung lässt sich eine Expression von Sox10 in der Neuralleiste nachweisen (102). Dabei ist u.a. Sox10 für die Differenzierung von Neuralleistenzellen in Gliazellen des PNS verantwortlich und notwendig. Ein Knockout von Sox10 führt hierbei zu einem Verlust von Gliazellen im PNS und im enterischen NS (103). Neben anderen Zellen stammen auch Hirn-Perizyten von der Neuralleiste ab. Diese exprimieren während der embryologischen Entwicklung Sox10, wohingegen Sox10 in Perizyten des adulten Hirns nicht mehr detektierbar ist (104).

1.4.2.3 Sex determining region Y-box transcription factor 17 (Sox17)

Der Transkriptionsfaktor Sox17 wird während der embryologischen Entwicklung in Zellen des Entoderms exprimiert und ist essenziell für die Entwicklung des Darmrohrs. Daher zeigen Teile des Darmrohrs im Laufe der Entwicklung eine starke Expression von Sox17. Bei einem Knockout kommt es zu Beeinträchtigungen der Darmentwicklung wie u.a. zu einem Mangel an endodermalen Zellen im Vorderdarm und Degenerationen verschiedener Darmrohranteile (105). Außerdem ist Sox17 in Endothelzellen sich entwickelnder Gefäße exprimiert und verantwortlich für die ordnungsgemäß ablaufende postnatale Angiogenese. Dabei stört ein Verlust von Sox17 bei gleichzeitigem, homozygotem Verlust von Sox18 die Angiogenese und die Migration von Endothelzellen, sodass neu bildende Gefäße eine reduzierte Länge sowie eine reduzierte Anzahl verzweigter Gefäßäste aufweisen. Nieren und Leber weisen Störungen der Vaskularisation auf, wodurch es postnatal nach ca. einer Woche zu Nekrosen kommt (106). Neben physiologischer Angiogenese ist Sox17 auch verantwortlich für die Tumor-Angiogenese vaskularisierter Tumore. Sox17 wird in Tumor-assoziierten Endothelzellen stark exprimiert und fördert sowohl Tumor-Angiogenese als auch Metastasierung und dadurch die Tumorprogression.

Infolgedessen kommt es zum typischen, pathologischen Tumor-assoziierten Gefäßstatus. Ein Knockout von Sox17 in Tumor-assoziierten Endothelzellen bewirkt eine Hemmung des Tumorwachstums, der Tumor-Angiogenese und eine Normalisierung des pathologischen Gefäßzustands im Tumor mit einhergehender Hemmung der Metastasierung sowie Verbesserung der Sauerstoffversorgung. Eine Überexpression zeigt einen gegenteiligen Effekt und verstärkt dadurch die Tumor-Progression. Dagegen findet bei ruhendem, nicht-proliferativem Gefäßzustand keine nachweisbare Expression von Sox17 statt. Somit versetzt die Expression von Sox17 Endothelzellen in einen Angiogenese-aktiven Zustand. Eine erhöhte Expression von Sox17 ist u.a. in Tumor-assoziierten Endothelzellen des GBM, allerdings nicht in Gliomen niedrigeren Grades, vorzufinden, was nochmals die Bedeutung von Sox17 für stark vaskularisierte Tumore wie dem GBM hervorhebt. Im Gegensatz zu den Tumor-assoziierten Endothelzellen weisen Perizyten angiogener, Tumor-assoziiierter Gefäße jedoch keine Expression von Sox17 auf (107).

1.4.2.4 Protein S100-β

Das Protein S100-β wird in verschiedenen Gliazellen des ZNS während der embryonalen Entwicklungsphase, postnatal und in der adulten Phase exprimiert. Dazu gehören neben Astrozyten v.a. Oligodendrozyten. S100-β-positive Astrozyten finden sich v.a. in der grauen Substanz des ZNS, u.a. im Rückenmark. Außerdem kommt es postnatal vom vierten bis zum siebten Tag postnatal (P4 bis P7) zu einer Hochregulation von S100-β in Astrozyten des Kortex mit anhaltender Expression auch im adulten Alter. Bei Oligodendrozyten dagegen findet sich eine Expression v.a. in der weißen Substanz des ZNS bzw. im Rückenmark, im Corpus Callosum des Hirns und im Kortex, wobei der Anteil im Kortex im weiteren Verlauf abnimmt. S100-β bleibt trotzdem auch im adulten Alter exprimiert, u.a. im Corpus callosum und im Kortex (108). Neben dem ZNS wird S100-β auch in Gliazellen des PNS exprimiert. Hier findet sich eine Expression bspw. in Schwann'schen Zellen und Satellitenzellen (109).

Versuche mittels Immunelektronenmikroskopie zeigten, dass Perizyten für S100 negativ sind. Dabei wurden Gewebeschnittproben mit einem Mittel angefärbt, das sowohl auf die α- als auch die β-Untereinheit von S100 reagiert. Perizyten zeigten hierbei keine Farbreaktion (110).

Aus den oben genannten Gründen wurden Sox2, Klf4 und c-myc als generelle Stammzellmarker verwendet. Sox10 und S100- β dienten als Marker für Gliazellen. Sox17 fand ebenso Anwendung als allgemeiner und vaskulärer Stammzellmarker.

1.4.3 Endotheliale bzw. Angiogene Marker

1.4.3.1 *Cadherin 5 (CDH5)*

Das Zelladhäsionsmolekül CDH5, auch vascular endothelial Cadherin (VE-Cadherin) genannt, wird bereits früh in der embryonalen Entwicklung in sämtlichen gefäßbildenden Endothelzellen vaskularisierter Organe exprimiert. Die Expression ist konstitutiv und spezifisch für Endothelzellen. CDH5 ist sowohl embryonal in Gefäßen entwickelnder Organe und großen Gefäßen als auch im adulten Alter u.a. in der Lunge und im Herzen nachweisbar. VE-Cadherin wird flächendeckend sowohl in murinen als auch in humanen Endothelzellen exprimiert. Es ist ein hochgradig konserviertes Protein und erfüllt speziesübergreifend die gleiche Funktion. Funktionell ist VE-Cadherin für die Zelladhäsion zuständig. Endothelzellen bilden mithilfe von VE-Cadherin durch interzelluläre Kontakte Zellverbände. In vitro lässt sich dies durch reduzierte Zellablösung und erhöhte Zellaggregation nach Hochregulation von VE-Cadherin beobachten. VE-Cadherin ist als Transmembranprotein in die Zellmembran integriert und lässt sich deshalb auf der Zelloberfläche sowie interzellulär an den Zellgrenzen nachweisen. Durch die erhöhte Zelladhäsion und zunehmenden Zell-Zell-Kontakte senkt VE-Cadherin die Zellmigration sowie die interzelluläre Permeabilität, wobei v.a. letzteres für die Funktion der Endothelzellen von enormer Bedeutung ist (111-113).

1.4.3.2 *Endoglin*

Endoglin ist ein Glykoprotein und wird in Endothelzellen exprimiert. Es handelt sich um ein integrales Membranprotein vom Typ I (114). Funktionell stellt Endoglin einen TGF- β -Rezeptor Typ III dar, der bei Bindung von TGF- β einen Komplex mit den TGF- β -Rezeptoren Typ I und II bildet. Endoglin erhöht dabei die Affinität des TGF- β -Rezeptors Typ II für dessen Liganden TGF- β und moduliert dadurch die Signalübertragung (115).

Endoglin wird flächendeckend in sämtlichen Endothelzellen des Körpers exprimiert. Auch Tumor-assoziierte Endothelzellen exprimieren Endoglin und regulieren die Expression nochmals hoch. Die hochregulierte Expression von Endoglin korreliert dabei mit der Expression verschiedener Proliferationsmarker, findet sich v.a. in vaskularisierten Tumorgebieten vor und ist daher assoziiert mit aktiver Tumor-Angiogenese (116).

1.4.3.3 Thrombomodulin (TM)

Das Transmembranrezeptor-Protein TM wird in Endothelzellen sämtlicher Gefäße im gesamten Körper exprimiert (117). Dabei wirkt es stabilisierend auf das Endothelium und reguliert seine Permeabilität sowie die Expression verschiedener Moleküle, die mit Entzündungs- und Koagulationsvorgängen assoziiert sind. Dadurch fördert es die Homöostase der Endothelzellen. Bei einem Knockout von TM kommt es zu einem Verlust von VE-Cadherin und dadurch zu einer erhöhten Permeabilität. Endothelzellen mit TM-Mangel zeigen eine erhöhte Sensibilität für Entzündungsmediatoren, wodurch ein inflammatorischer Zustand des Endothels gefördert wird. In diesen Endothelzellen kommt es u.a. zu einer Hochregulation von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen, wodurch die Leukozyten- und Thrombozyten-Adhäsion am Endothel erhöht wird (118).

1.4.3.4 Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1)

VCAM-1 ist ein Transmembran-Glykoprotein, gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und ist verantwortlich für die Zelladhäsion und -Migration verschiedener Leukozyten und somit für deren Rekrutierung. Unter inflammatorischen Bedingungen wird die Expression von VCAM-1 in Endothelzellen von verschiedenen Entzündungsmediatoren induziert. Zu den Leukozyten, die zur Adhäsion an VCAM-1 befähigt sind, gehören verschiedene Lymphozyten und neutrophile Granulozyten. Durch Bindung verschiedener Leukozyten mit anschließender Transmigration durch die Endothelzellschicht unter inflammatorischen Bedingungen spielt VCAM-1 bei entzündlichen Vorgängen eine wichtige Rolle (119-121). Zwar trägt VCAM-1 in manchen Tumoren ebenfalls zur Transmigration von Tumorzellen durch Tumor-assoziierte Endothelzellen bei und begünstigt die dadurch Entstehung von Metastasen. Die Tumor-Gefäße, die aber aus der Tumor-Angiogenese hervorgehen, weisen dagegen häufig eine immunsuppressive, tumorfördernde

Reduktion der VCAM-1-Expression auf, um den Tumor vor einer Immunantwort zu schützen (119).

Exprimiertes VCAM-1 proliferierender Perizyten steht bei Neovaskularisation zudem über ein bestimmtes Integrin in interzellulärem Kontakt mit proliferierenden Endothelzellen. Bei Hemmung dieser Interaktion wird die Gefäßneubildung gehemmt und es kommt zur Apoptose der Endothelzellen und der Perizyten. VCAM-1 spielt bei Neovaskularisation somit eine tragende Rolle (122).

1.4.3.5 Fetal liver kinase 1 (Flk-1)

Das Gen Flk-1 kodiert einen Tyrosinkinase-Rezeptor mit hoher Spezifität für VEGF, der bei Vaskulogenese und Angiogenese in aktivierten endothelialen Vorläuferzellen sowie ausgereiften Endothelzellen zur Bildung neuer Gefäße hochreguliert wird. Dies geschieht bereits in der embryonalen Entwicklung und lässt sich in sämtlichen, sich bildenden Gefäßen und Organen, die eine starke Vaskularisation entwickeln, nachweisen (123-125). Zudem ist die Expression von Flk-1 Voraussetzung für die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen zu ausgereiften Endothelzellen, die im Rahmen der Vaskulogenese abläuft. Bei homozygoter Flk-1-Deletion bleibt die Vaskulogenese, die der Neubildung und Entwicklung sämtlicher Blutgefäße entspricht, aus und führt zu embryonal weitläufigen Nekrosen mit bereits pränatal letalem Ausgang. Endotheliale Vorläuferzellen sind zwar weiterhin vorhanden und bleiben nachweisbar, entwickeln sich allerdings bei homozygoter flk-1-Mutation nicht zu ausgereiften Endothelzellen weiter (126).

Tumorzellen im GBM sezernieren vermehrt VEGF und erhöhen dessen Expression unter Sauerstoffmangel und auftretender Tumornekrose in unmittelbarer Zellumgebung. Während Flk-1 nicht im Endothel der normalen Hirngefäße nachweisbar ist, wird der VEGF-Rezeptor in Tumor-assoziierten Endothelzellen stark hochreguliert. Durch die aktivierte VEGF / Flk-1-Signalachse induziert das GBM die Tumor-Angiogenese, die sich durch Hemmung bzw. Knockout von Flk-1 hemmen lässt. Ein Knockout von Flk-1 hemmt zudem das Tumorwachstum des GBM (127, 128).

1.4.3.6 Cluster of differentiation 31 (CD31)

CD31 bzw. Platelet / endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) ist ein integrales Glyko-Membranprotein und zeigt eine starke und flächendeckende Expression in sämtlichen Endothelzellen (129-131). Zudem wird CD31 in verschiedenen, weiteren Zellen exprimiert, einschließlich verschiedener Leukozyten wie T-Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen (131). Funktionell erfüllt CD31 viele verschiedene Aufgaben, zu denen u.a. die Regulation der Endothelzellmigration und Integrität der vaskulären Endothelzellschicht gehören. Zu diesem Zweck findet sich das CD31-Protein u.a. vermehrt interzellulär zwischen den Endothelzellen vor. So stabilisiert CD31 die Permeabilität des Endothels. Außerdem reguliert CD31 so auch die Transmigration verschiedener Leukozyten ins Gewebe, die u.a. im Rahmen entzündlicher Prozessen erhöht wird (131, 132). Die Unterstützung von Angiogenese stellt eine weitere Funktion von CD31 dar, die über CD31-Antikörper gehemmt werden kann (133). Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in Bezug auf die Tumor-Angiogenese in verschiedenen Tumormodellen (134).

Aus den oben genannten Gründen werden CDH5, Endoglin, Thrombomodulin, VCAM-1, Flk-1 und CD31 im Folgenden als endotheliale, angiogene Marker verwendet.

1.5 Zusammenfassende Fragestellung

Vor diesem Hintergrund ist noch unklar, welche Auswirkungen TGF- β , welches von verschiedenen GBM-Zelllinien in hohen Konzentrationen sezerniert wird und somit im GBM sowie peritumoral in hohen, relevanten Mengen vorkommt, auf die Perizyten der BBB hat. Da Perizyten multipotente Stammzeleigenschaften annehmen können, zu einer funktionierenden BBB beitragen und zur Tumor-Angiogenese des Glioblastoms rekrutiert werden können, bleibt die Frage offen, inwieweit Hirn-Perizyten selbst zum Tumor-Progress beitragen. Wie bereits oben im Kapitel „*Perizyten als Bestandteil der BBB und ihre Funktion*“ erwähnt, nehmen Perizyten unter hypoxischen Umweltbedingungen, wie solche im GBM, Stammzeleigenschaften an. Es wurde zudem gezeigt, dass TGF- β in Perizyten die Expression des EMT-Regulators SLUG induziert. Des Weiteren trägt TGF- β

neben seiner Fähigkeit, EMT auszulösen, in verschiedenen, weiteren Gesichtspunkten zur Tumorprogression bei. Zusammengefasst kristallisiert sich durch diese Hintergrundinformationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Forschungsfrage heraus:

Wie beeinflussen GBM-Zellen den Differenzierungsstatus von Perizyten GBM-assoziiierter Gefäße? Vollziehen Perizyten durch TGF- β eine EMT mit anschließender Transdifferenzierung zu vaskulären Zellen und tragen somit zur Tumor-Angiogenese bei?

Um diese Frage zu beantworten, behandelten wir Perizyten mit TGF- β 1 und - β 2, um zu untersuchen, ob diese infolge der Behandlung dedifferenzieren, Stammzeleigenschaften annehmen und eine EMT mit anschließender Umprogrammierung bzw. Transdifferenzierung in andere Zelltypen der BBB durchlaufen. Zur Untersuchung zogen wir HBVPs sowie die vorgestellten, perizytären Zellmarker, die Stammzellmarker sowie die endothelialen bzw. vaskulären Zellmarker heran.

2 Material und Methoden

2.0 Geräteliste

Gerät und Modell	Marke
Handpipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Heiz- / Kühl-Schüttler, Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Inkubator-Schrank, CO ₂ Inkubator	Sanyo (München, Deutschland)
Pipetten, Größe 10 / 100 / 1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierer, Accu Jet Pipette Pro Controller	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
qPCR-Maschine, 7500 Fast Real Time PCR	Applied Biosystems (Waltham, USA)
Spektralphotometer, NanoDrop ND 1000	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Sterilbank, Hera Safe	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Wasseraufbereitung, MilliQ Integral	Merck / Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Zellzählkammer, Neubauer-Typ	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Zentrifuge, Biofuge Pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)

2.1 Materialliste

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Marke
6-Well-Platten	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Cell-Scraper	Corning (New York, USA)
Einmal-Pipetten, 5 / 10 / 25 ml	Corning (New York, USA)
Falcon, 15 ml	Corning (New York, USA)
Millipore-Wasser (Ultrarein), Milli Q Integral	Merck / Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen	Ratiolab (Dreieich, Deutschland)
Reaktionsgefäß, 0,5 / 1,5 / 2 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
RNA-Isolations-Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
RT-qPCR Klebefolie	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
RT-qPCR Platten	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturflaschen, T75	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien, Medien, Reagenzien, Zelllinien

Accutase	PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
dNTP's, 20 mM	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanol 99%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Fetal bovine serum (FBS) bzw. Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Human brain vascular pericytes (HBVPs), humane Perizyten des Hirns	ScienCell (San Diego, USA)
M-MLV Reverse Transkriptase, Super-script II Enzyme	Promega (Madison, USA)
M-MLV RT 5x Buffer	Promega (Madison, USA)
Oligo dT-Nukleotide, 100 µM	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland)
Pericyte Growth Supplement (PGS)	ScienCell (San Diego, USA)
Perizytenmedium	ScienCell (San Diego, USA)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Rekombinantes TGF-β1	Pepro Tech (Cranbury, USA)
Rekombinantes TGF-β2	Pepro Tech (Cranbury, USA)
Sybr Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trypanblau, 0.4%	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
--------------	--------------------------------

2.1.3 Verwendete Software

Software und Verwendung	Entwickler
Microsoft Excel, Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft PowerPoint, Präsentationsprogramm	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Word, Textverarbeitungsprogramm	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
NanoDrop 1000, Software des Spektralphotometers	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
qPCR 7500 Software, RT-PCR-Software	Applied Biosystems (Waltham, USA)
SPSS Statistics, Statistiksoftware	IBM (Armonk, USA)

2.2 Primer

- Alle Primer in 5'=> 3'- Orientierung
- Stock-Lösung bei 100 µM
- Aufbewahrt bei -20 °C
- Hersteller: Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

Name	Sequenz in 5'-3' Orientation
RGS5 – human – fw. Primer	CTGGATTGGCTGGAAGAGCA

RGS5 – human – rev. Primer	TTGCACATTTTGGCAGGTGG
SOX10 – human – fw. Primer	GCTGAACGAAAGTGACAAGCG
SOX10 – human – rev. Primer	CGCTCTTGTAGTGGGCCTGG
S100- β – human – fw. Primer	AAATGCGTTCCTCATCCATGC
S100- β – human – rev. Primer	GCGAGTTCTGATGGAGTTGC
Sox17 – human – fw. Primer	TGGACCGCACGGAATTTGAA
Sox17 – human – rev. Primer	GGACACCACCGAGGAAATGG
CDH5 – human – fw. Primer	CGACCTCCGATACATGAGCC
CDH5 – human – rev. Primer	CAGGACCAGCTGGAAGTGGTA
CD31 – human – fw. Primer	TGAGAACCACGCCTAGCCAA
CD31 – human – rev. Primer	TGCTCGGTTCTCTCTGTGACT
PDGFR- β – human – fw. Primer	GGAGAGGGCAGTAAGGAGGA
PDGFR- β – human – rev. Primer	ATGGTGTCTTCTGCTGCTGAT
CSPG4 – human – fw. Primer	GAGCCCAGGCACGAAAAATG
CSPG4 – human – rev. Primer	GTATGTTTGGCCCCTCCGAA
CD146 – human – fw. Primer	CGGGAGACCAGGGAGAGAAA
CD146 – human – rev. Primer	AGTCCCTTTGGAGGCTTTGG
Sox2 – human – fw. Primer	ACATGAACGGCTGGAGCAA
Sox2 – human – rev. Primer	GTAGGACATGCTGTAGGTGGG
c-Myc – human – fw. Primer	AGAGTTTCATCTGCGACCCG

c-Myc – human – rev. Primer	GAGAAGCCGCTCCACATACA
Klf4 – human – fw. Primer	ATGCTCACCCACCTTCTTC
Klf4 – human – rev. Primer	TTCTCACCTGTGTGGGTTCCG
Endoglin – human – fw. Primer	TACCACAGCCTTCATCTGCG
Endoglin – human – rev. Primer	AGTTGCTGTCCGAAGGATGG
Thrombomodulin – human – fw. Primer	CCTAATGACAGTGCGCTCCT
Thrombomodulin – human – rev. Primer	CTGGTGTTGTTGTCTCCCGT
VCAM-1 – human – fw. Primer	GGACCACATCTACGCTGACAA
VCAM-1 – human – rev. Primer	CTCCAGAGGGCCACTCAAAT
Flk-1 – human – fw. Primer	CAAGTGGCTAAGGGCATGGA
Flk-1 – human – rev. Primer	ATTTCAAAGGGAGGCGAGCA

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultivierung

Die Human Brain Vascular Pericytes (HBVPs), die zur Behandlung mit TGF- β herangezogen wurden, wurden maximal bis zur neunten Passage verwendet, um den Erhalt ihrer zellulären Eigenschaften zu gewährleisten. Dabei wurden HBVPs in Perizyten-Medium unter jeweils einprozentiger Zugabe von P/S und PGS sowie unter zweiprozentiger Zugabe von FCS kultiviert (Perizyten-Vollmedium). Für die serumfreie Kultivierung wurde lediglich auf FCS verzichtet (serumfreies Perizytenmedium). Dazu wurden im Vorfeld die Oberflächen der jeweiligen Zellkulturflaschen und Six-Well-Platten mit Poly-L-Lysin beschichtet, für mindestens zwei Stunden im Inkubator belassen und anschließend zweimal mit PBS gewaschen, da die HBVPs adhärent wachsen und hierfür die Poly-L-Lysin-Beschichtung benötigen. Die Kultivierung der Zellen fand anschließend im Inkubator bei

einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Luftanteil von 5% statt. Die Zellen wurden möglichst keimfrei unter einer herkömmlichen Sterilbank behandelt.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig ausgedünnt und von einer zur nächsten Passage fortgeführt. Dafür wurde das Perizyten-Vollmedium abgesaugt und die adhärenen Zellen nach einem kurzen Waschvorgang mittels PBS anschließend mit Accutase behandelt. Dadurch lösten sich die Zellen nach zwei- bis dreiminütiger Wartezeit bei Raumtemperatur von der Oberfläche ab. Die abgelösten Zellen wurden durch erneute Zugabe von Zellmedium ausgedünnt und erneut ausgesät. Diese erneute Kultivierung setzte dabei die Zellpassage fort. Die entfernten Zellen wurden bei -80°C eingefroren. Hierfür wurden diesen gelösten Zellen zusätzlich zum Zellmedium 10% DMSO zugesetzt. Die Zellen wurden langsam eingefroren und bei Bedarf schnell wieder aufgetaut und in Zellmedium gelöst.

2.3.2 Auszählung von Zellen

Die Zellen wurden zur Auszählung mit Trypanblau angefärbt, in eine Neubauer-Zellzählkammer pipettiert und mikroskopisch ausgezählt. Dazu wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen mittels Accutase von der Oberfläche der Zellkulturflasche bzw. Six-Well-Platte abgelöst. Die abgelösten Zellklumpen wurden durch wiederholte Pipettiervorgänge aufgelöst und anschließend mit Trypanblau in einem 1:1 Verhältnis gemischt und angefärbt. Dabei wurde neben der Zellzahl auch die Viabilität der Zellen überprüft.

2.3.3 Zellbehandlung

Am ersten Tag wurde der Versuch vorbereitet, indem die HBVPs in Six-Well-Platten ausgesät wurden. Dazu wurden die Six-Well-Platten nach obigem Schema zunächst zwei Stunden lang mit Poly-L-Lysin beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in Perizyten-Vollmedium gelöst und auf zwei Zellplatten je Behandlungskondition pipettiert. Pro Well wurden ca. 250.000 HBVPs ausgesät und hierfür 2 ml Perizyten-Vollmedium verwendet. Zuletzt wurden die ausgesäten Zellen in den Inkubator gestellt und dort bis zum nächsten Tag zur Anhaftung an die Oberfläche inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der HBVPs mit TGF- β . Dazu wurde zunächst das Perizyten-Vollmedium aus den Zellplatten abgesaugt. Anschließend folgte ein zweimaliger Waschvorgang der Zellplatten mittels PBS. Daraufhin wurden zwecks Behandlung jeweils 2 ml von TGF- β -haltigem, serumfreiem Perizytenmedium pro Zellplatte pipettiert. Hierfür wurden TGF- β 1 und TGF- β 2 in serumfreies Perizytenmedium gelöst. Die Behandlungskonditionen umfassten Konzentrationen von jeweils 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml, während die zur Kontrollgruppe gehörenden Perizyten unbehandelt blieben (Tab. 1).

Tab. 1: Exemplarische Planung einer Zellkultur

Abgebildet sind drei 6-Well-Platten mit ausgesäten, in Dupletts angelegten HBVPs, unbehandelt als Kontrolle und behandelt mittels TGF- β in den jeweiligen Konzentrationen (Vol.: 2 ml / Well).

1. Platte	Kontrolle	TGF- β 1; 1 ng/ml	TGF- β 1; 5 ng/ml
1. Platte	Kontrolle	TGF- β 1; 1 ng/ml	TGF- β 1; 5 ng/ml
2. Platte	TGF- β 1; 10 ng/ml	TGF- β 2; 1 ng/ml	TGF- β 2; 5 ng/ml
2. Platte	TGF- β 1; 10 ng/ml	TGF- β 2; 1 ng/ml	TGF- β 2; 5 ng/ml
3. Platte	TGF- β 2; 10 ng/ml	-	-
3. Platte	TGF- β 2; 10 ng/ml	-	-

Zuletzt wurden die TGF- β -behandelten HBVPs in den Six-Well-Platten für eine achtzehnstündige Behandlungszeit in den Inkubator gestellt.

Am dritten Tag wurde nach der Behandlungszeit das Perizytenmedium zur Hälfte aus den Six-Well-Platten der behandelten HBVPs abgesaugt. Die Zellen wurden mikroskopisch auf Kontamination geprüft und danach mit dem Cell-Scraper von der Plattenoberfläche abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen mit dem restlichen Zellmedium in kleine Eppendorf-Gefäße pipettiert und zentrifugiert. Schließlich wurde das überschüssige Zellmedium abgesaugt. Die übrig gebliebenen Zellbestandteile wurden für die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) bzw. für die RNA-Isolation weiterverwendet.

2.3.4 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem Nucleospin RNA Plus-Kit von Macherey-Nagel durchgeführt. Hierfür wurde die Anleitung des Herstellers herangezogen. Um Kontaminationen zu vermeiden und möglichst hohe Mengen an isolierten RNA-Proben sicherzustellen, sollte so vorsichtig wie möglich gearbeitet werden.

Die Konzentrationsmessung erfolgte im Anschluss mittels des NanoDrop-Spektralphotometers bei Wellenlängen von 230, 260 und 280nm. Die isolierten RNA-Proben wurden ggf. zwischenzeitlich bei -80°C in der Kühltruhe aufbewahrt.

2.3.5 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA aus den Zellbestandteilen wurde im nächsten Schritt in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde die reverse Transkriptase Superscript II Enzyme verwendet.

Zur cDNA-Synthese wurden 5 μg der isolierten RNA mit RNase-freiem Wasser auf 13 μl aufgefüllt und mit jeweils 1 μl Oligo-dT-Primer (Kurze, einzelsträngige Oligonukleotide, 100 μM) und 1 μl Desoxyribonukleosidtriphosphat-Gemisch (dNTP, 20 mM) ergänzt. Danach wurde die Mischung 10 min lang in 70°C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurden 4 μl des 5x First Strand Buffer hinzugefügt, gemischt und 2 min lang bei 42°C in einem Schüttler-Heizblock Gerät inkubiert.

Daraufhin wurde unter äußerster Vorsicht 1 μl Superscript II Enzyme hinzugefügt. Es folgte ein weiterer Inkubationszyklus von 60 min bei 42°C im Schüttler-Heizblock und anschließend 10 min bei 70°C im Wasserbad, um die reverse Transkriptase Superscript II Enzyme zu inaktivieren. Das Gemisch hatte nun ein Volumen von 20 μl .

Zuletzt wurden 30 μl RNase-freies Wasser hinzugefügt, sodass zum Schluss ein Endvolumen von 50 μl resultierte. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Bei zu niedriger Ausgangskonzentration der synthetisierten RNA wurden 2,5 µg anstatt 5 µg verwendet und mit RNase-freiem Wasser auf 13 µl aufgefüllt. Um dieselbe Ausgangskonzentration zu erreichen, wurden dem Gemisch am Ende statt 30 µl nur 5 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt, sodass mit einem Endvolumen von 25 µl dieselbe Endkonzentration trotz niedrigerem Endvolumen resultierte.

2.3.6 qPCR

Die Veränderungen der Genexpression ausgewählter zellulärer Gen-Marker wurden per qPCR-Verfahren quantitativ untersucht. Dazu wurden die cDNA-Proben mit dem Mastermix, der mit dem qPCR-Kit Sybr Green PCR Master Mix mitgeliefert wurde, in den einzelnen Wells der qPCR-96er-Well-Platte zusammengeführt. Hierfür wurden die zu testenden Gen-Zellmarker in horizontaler Richtung pipettiert, während im Vorfeld die cDNA-Proben der einzelnen Behandlungskonditionen auf jeden, zu testenden Gen-Zellmarker der qPCR-96er-Well-Platte in vertikaler Richtung vorgelegt wurden (Tab. 2).

Die cDNA wurde hierfür zunächst mit RNase-freiem Wasser in einem Verhältnis von 1:7 verdünnt. Um genügend Probenmaterial für 16 Wells sicherzustellen, wurde eine Lösung ausreichend für 18 Proben hergestellt:

$$12,85 \mu\text{l cDNA (stock von der cDNA-Synthese)} + 77,15 \mu\text{l H}_2\text{O (dest.)} = 90 \mu\text{l Gesamtvolumen (cDNA verdünnt)}$$

Zudem wurde für jeden Marker ein Mastermix-Ansatz für 11 Wells angefertigt, der somit sicherstellend für 10 Wells ausreichend war. Dazu wurde der Mastermix, der mit dem qPCR-Kit Sybr Green PCR Master Mix mitgeliefert wurde, mit den forward- und reverse-Primern des jeweiligen Markers und RNase-freiem Wasser gemischt.

Tab. 2: Exemplarische Planung einer qPCR-96er-Well-Platte

Der Mastermix der verschiedenen Marker-Testreihen in horizontaler Anordnung, die cDNA-Proben der einzelnen Behandlungskonditionen als Dupletts in vertikaler Anordnung (C = Kontrolle; b-1 = TGF-β, 1 n/ml; b-5 = TGF-β, 5 ng/ml; b-10 = TGF-β, 10 ng/ml).

MM/ cDNA	qPCR- Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-------------	----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

GAPDH	A	C	C	b- 1	b- 1	b- 5	b- 5	b- 10	b- 10	H ₂ O	H ₂ O	-	-
Sox2	B												
c-myc	C												
Klf4	D												
Sox10	E												
Sox17	F												
S100b	G												
CSPG4	H												

Pro Well wurden die verschiedenen Komponenten in folgender Weise gemischt:

1,9 µl RNase-freies Wasser + 0,3 µl forward-Primer + 0,3 µl reverse-Primer + 7,5 µl Mastermix = 10 µl Mastermix-Ansatz pro Well

Zur Vorbereitung eines Mastermix-Ansatzes für 11 Wells ergab sich somit:

20,9 µl H₂O + 3,3 µl forward-Primer (Marker 1) + 3,3 µl reverse-Primer (Marker 1) + 82,5 µl Mastermix = 110 µl Gesamtvolumen Mastermix (Marker 1)

Danach wurden pro Well jeweils 5 µl der verdünnten, synthetisierten cDNA (exemplarisch Kontrolle C) und 10 µl des angesetzten Mastermixes (exemplarisch Marker 1) pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 15 µl / Well resultierte (Tab. 3).

Die verschiedenen Marker wurden für jede Behandlungskondition hierbei im Duplett vorgelegt. Zur Kontrolle wurde das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Wasser wurde im selben Volumen als Negativkontrolle verwendet.

Die qPCR-Platte wurde nach dem Pipettiervorgang mit einer Folie versiegelt, kurz zentrifugiert und in das qPCR-Gerät (Applied Biosystems 750 Fast Real Time PCR Maschine) eingelegt.

Hierbei wurde das Standardprogramm für SYBR GREEN mit folgenden Einstellungen verwendet:

- Quantification Comparative
- SYBR GREEN
- 2h (Standard)
- 45 Cycles
- 96 Well-Plate (Thermo Fast)

Tab. 3: Exemplarische Durchführung eines qPCR-Versuchs

Unter Zusammenführung der cDNA und des Mastermixes resultierte ein Endvolumen von 15 μ l / Well. Die Behandlungskonditionen sind vertikal und die Marker-Testreihen horizontal ausgerichtet (C = Kontrolle; b-1 = TGF- β , 1 n/ml; b-5 = TGF- β , 5 ng/ml; b-10 = TGF- β , 10 ng/ml).

MM/cDNA	qPCR-Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GAPDH	A	C: 5ul cDNA (C) + 10ul Master- mix (GAPDH)	C	b- 1	b- 1	b- 5	b- 5	b- 10	b- 10	H ₂ O	H ₂ O
Marker 1	B	C: 5ul cDNA (C) + 10ul Master- mix (Mar- ker 1)	C	b- 1	b- 1	b- 5	b- 5	b- 10	b- 10	H ₂ O	H ₂ O

2.3.7 Auswertung der qPCR-Ergebnisse

Die statistische Auswertung der qPCR-Ergebnisse wurde mithilfe von Excel durchgeführt. Dazu wurde der Ct-Wert herangezogen, der den Wert für den Zyklus in der exponentiellen Phase der qPCR angibt, bei dem erstmals das Fluoreszenz-Signal über der

Nachweisgrenze hinaus detektiert werden konnte. Damit konnte die Expression zwischen den einzelnen Proben verglichen werden. Die Normalisierung erfolgte gegen die Ct-Werte des Haushaltgens GAPDH. Der daraus resultierende Wert wurde ΔCt genannt. Vom jeweiligen ΔCt wurde daraufhin der Mittelwert der Kontrolle subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Zuletzt wurde aus diesem resultierenden Wert mithilfe einer Exponentialrechnung mit $a = 2$ und $x = -\Delta\Delta\text{Ct}$ die n-fache Expression in Bezug auf die Kontrolle errechnet (Tab. 4).

Tab. 4: Auswertung der qPCR mittels Excel	
Zusammengefasstes Berechnungsschema (Δ = Differenz, Ct = detektierte Ct-Werte der qPCR).	
Berechnungsabschnitt	Formel
1. ΔCt :	$\Delta\text{Ct } 1 = \text{Ct (Probe 1; Behandlungskondition 1; Marker x)} - \text{Ct (Probe 1; GAPDH)}$
2. $\Delta\Delta\text{Ct}$:	$\Delta\Delta\text{Ct } 1 = \Delta\text{Ct } 1 - \text{Mittelwert } \Delta\text{Ct (Kontrolle)}$
3. N-fache Expression:	$n\text{-fache Expression} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct } 1)}$

2.3.8 Statistische Analyse der ausgewerteten qPCR-Ergebnisse

Zur statistischen Analyse der ausgewerteten qPCR-Ergebnisse wurde SPSS verwendet. Dafür wurden aus den Ergebnissen der einzelnen, in Dupletts durchgeführten Versuche die Mittelwerte errechnet und herangezogen. Obwohl die Stichprobengröße hierbei bei $n = 2 - 5$ lag und zu niedrig war, um bezüglich der Verteilung der Daten eine aussagekräftige Annahme zu treffen, wurde in der vorliegenden Arbeit von einer Normalverteilung ausgegangen. Um diese Annahme zu stützen, wurde zur Testung der Normalverteilung trotzdem der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Daraufhin wurden die Daten zur Prüfung der Varianzhomogenität, basierend auf dem Mittelwert, dem Levene-Test unterzogen. Weil nicht für alle Datenreihen der getesteten Marker Varianzhomogenität vorlag und mehr als zwei Zellgruppen auf Unterschiede in der Expression des jeweiligen Markers verglichen wurden, wurde für alle Datenreihen die Welch-ANOVA herangezogen, da parametrische Testverfahren ohnehin zumeist robust auf Verletzungen der Normalverteilung als Bedingung reagieren (135). Durch die flächendeckende Verwendung eines festgelegten

Testverfahrens soll die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verbessert werden. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses des Shapiro-Wilk-Tests der behandelten Zellgruppen wurde trotzdem zwecks zusätzlicher Transparenz ergänzend der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zum direkten Vergleich mit der Welch-ANOVA angewendet. Die unbehandelte Kontrollgruppe wurde ohnehin auf eins normalisiert, sodass der Shapiro-Wilk-Test bezüglich der Kontrolle nicht bedeutsam war und nur im Interesse der Vollständigkeit ergänzt wurde. Bei signifikanten Ergebnissen des Globaltests wurde anschließend bei Varianzhomogenität der Post-hoc-Test nach Dunnett-T3 und bei Varianzheterogenität nach Dunnett-T eingesetzt. Als Effektstärkemaß zur Testung der Relevanz der Ergebnisse wurde ab einem $p = 0,1$ das partielle η^2 angegeben, um damit anschließend die Effektstärke f der Welch-ANOVA nach Cohen zu berechnen. Die Formel hierfür lautet $f = \sqrt{(\eta^2 / (1 - \eta^2))}$. Die Effektstärke gilt ab einem $f = 0,1$ als klein, ab $f = 0,25$ als mittel und ab $f = 0,4$ als groß (136). Das Signifikanzniveau lag bei $\alpha = 0,05$. Der errechnete p-Wert wurde zur Feststellung der Signifikanz herangezogen:

- * $p < 0,05$
- ** $p < 0,01$
- *** $p < 0,001$

Zur Abbildung der deskriptiven Statistik wurden Säulendiagramme erstellt und hierfür die errechneten Mittel- und Standardabweichungswerte herangezogen.

Im Interesse des Leseflusses wurden die behandelten Zellgruppen nach ihrer jeweiligen Behandlungskondition benannt. Exemplarisch erhielten so die mittels 1 ng/ml TGF- β 1 behandelten Zellgruppen den Namen „TGF- β 1; 1 ng/ml“.

3 Ergebnisse

3.0 Generelle Probleme in der Datenerhebung

Während der Versuchsdurchführung wiesen die herangezüchteten Zellen mehrfach Kontaminationen auf und machten einen Neustart des Versuchs notwendig. Nach längerer Behandlungszeit mit TGF- β 1 und TGF- β 2 lösten sich die behandelten Zellen von der Zellplatte ab, was die Ernte qualitativen Zellmaterials für den weiteren Versuchsablauf verhinderte. Das Zeitfenster hierfür lag bei ca. 20 h. Bei der Zellernte war es entscheidend, das Zellmaterial effizient aufzusammeln, um eine ausreichende Menge an RNA für den weiteren Versuchsablauf sicherzustellen. Die Zellernte lieferte dabei nicht immer genügend Zellmaterial. Außerdem war eine besonders genaue Durchführung der einzelnen Vorgänge von der RNA-Isolierung über die cDNA-Synthese bis zur qPCR für den Ablauf der Experimente entscheidend. Gelegentlich war eine Wiederholung der Versuche notwendig. Vor allem die qPCR der einzelnen Teilversuche musste mehrfach wiederholt werden, da die Ct-Werte der Proben innerhalb der Dupletts als auch zwischen den Dupletts sowohl der Zellgruppen als auch der GAPDH-Referenzreihe teils zu große Differenzen zeigten und nicht auswertbar waren. Deshalb konnten solche Teilversuche als Ganzes oder auch nur einzelne Behandlungszellgruppen mit größeren Ct-Wert-Differenzen als Hinweis auf Pipettierfehler oder Diskrepanzen in den cDNA-Konzentrationen der verwendeten Proben zueinander nicht in die Gesamtauswertung miteinbezogen werden. Des Weiteren waren einige qPCRs aufgrund mangelnder Funktionsfähigkeit der verwendeten Oligonukleotide fehlerhaft und nicht auswertbar. Diese mussten ebenfalls unter Verwendung neuer, frisch aufgesetzter Oligonukleotide wiederholt werden.

3.1 Der Einfluss von TGF- β 1 bzw. TGF- β 2 auf die untersuchten Differenzierungsmarker

3.1.1 Nicht exprimierte Marker

Für die im Folgenden vorgestellten Marker konnte per qPCR-Verfahren sowohl vor als auch nach der Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2 keine Expression detektiert werden. Die Detektionsgrenze der qPCRs lag in den Experimenten bei einem Ct-Wert von ca. 30-31. Es wird angenommen, dass höhere Ct-Werte eher auf eine fehlende Expression und

allenfalls auf ein unspezifisches PCR-Signal hinweisen. Ct-Werte größer als die der Wasserprobe sind als ein sicher negatives Ergebnis zu deuten.

3.1.1.1 RGS5

Die Versuchsreihen mit TGF- β 1 und - β 2 konnten jeweils keine Expression von RGS5 in den HBVPs detektieren. In der Versuchsreihe von TGF- β 1 ergab sich für die Kontrollgruppe und die behandelten Zellgruppen der Konzentration 1 ng/ml, 5 ng/ml und 10 ng/ml eine Versuchszahl von $n = 3$. Die Versuchszahl der TGF- β 2-Versuchsreihe lag für die Kontrolle und die behandelten Zellgruppen bei $n = 2$. Allerdings lagen die Ct-Werte innerhalb der Dupletts der RGS5-Testreihe häufig weit auseinander, obwohl die Ct-Werte der GAPDH-Referenzreihe innerhalb der einzelnen Dupletts der Zellgruppen nah beieinander lagen und somit auf eine korrekte Pipettierung hindeuteten. Zudem lagen die Ct-Werte der RGS5-Testreihe kontinuierlich unter der Detektionsgrenze im Sinne einer fehlenden Detektion von RGS5. Für eine statistische Berechnung waren die Daten der RGS5-Testreihe in beiden TGF β -Versuchsreihen nicht auswertbar.

3.1.1.2 Sox2

In den Versuchsreihen von TGF- β 1 und - β 2 konnte in den unbehandelten HBVPs keine Expression von Sox2 detektiert werden.

Zwei Teilversuche der TGF- β 1-Versuchsreihe waren zwar aufgrund großer Ct-Differenzen innerhalb der Dupletts als auch zwischen den Zellgruppen statistisch nicht auswertbar, zeigten aber ohnehin Ct-Werte außerhalb der Detektionsgrenze. Dadurch kam es in der Versuchsreihe von TGF- β 1 für die Kontrollgruppe ($m = 1,05$; $SD = 0,08$) und die behandelten Zellgruppen der Konzentration 1 ng/ml ($m = 1,44$; $SD = 1,22$), 5 ng/ml ($m = 1,16$; $SD = 1,37$) und 10 ng/ml ($m = 1,21$; $SD = 0,74$) bezüglich des statistischen Testverfahrens zu einer Versuchszahl von $n = 3$. Zwar lagen auch hier vereinzelt höhere Differenzen der Ct-Werte einzelner, behandelter Zellgruppen innerhalb des Dupletts bzw. zu den übrigen Zellgruppen vor, jedoch lagen diese ohnehin wie bereits vor der Behandlung unterhalb der Detektionsgrenze. Der Shapiro-Wilk-Test attestierte für die Daten der behandelten Zellgruppen eine Normalverteilung ($p > 0,05$), jedoch nicht für die der

Kontrollgruppe ($p = 0,021$). Zwischen den Gruppen war Varianzhomogenität gegeben ($p > 0,05$). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen in Bezug auf die nicht detektierbare Expression von Sox2, Welch-Test $F(3, 3,37) = 0,11$; $p = 0,950$ (Abb. 1).

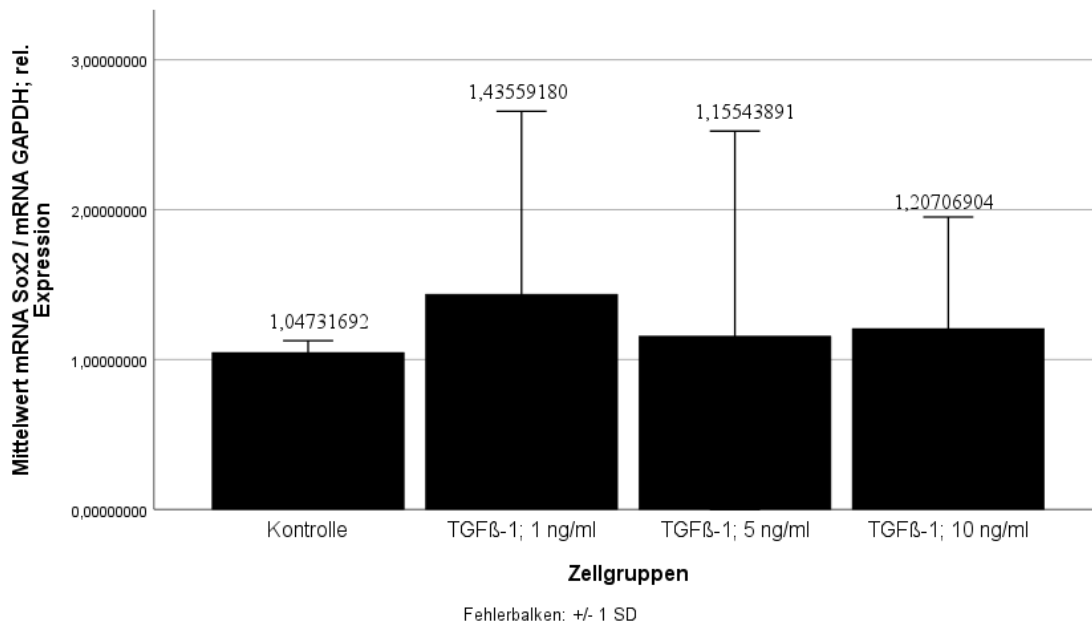


Abb. 1 Mittlere Expression von Sox2 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1; 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von Sox2 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 3$; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

In der TGF- β 2-Versuchsreihe wurde ein Teilversuch wegen zu hoher Differenzen der Ct-Werte zwischen den Zellgruppen in der GAPDH-Referenzreihe der qPCR von den Analysen ausgeschlossen. Für die Kontrolle ($m = 1,02$; $SD = 0,03$) und die behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 1,07$; $SD = 0,86$), „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 1,05$; $SD = 1,12$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 0,79$; $SD = 0,62$) kam es dadurch zu einer Versuchszahl von $n = 4$. Auch hier lagen die Ct-Werte der behandelten Zellgruppen jedoch wie auch vor der Behandlung weiterhin unterhalb der Detektionsgrenze. Laut Shapiro-Wilk-Test lag für die Daten der behandelten Zellgruppen Normalverteilung vor ($p > 0,05$), nicht jedoch für die Kontrollgruppe ($p = 0,010$). Gemäß dem Levene-Test existierte keine

Varianzhomogenität ($p = 0,006$). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen hinsichtlich der nicht detektierbaren Expression von Sox2, Welch-Test $F(3, 5,02) = 0,15$; $p = 0,923$ (Abb. 2).

Zusammengefasst gab es in beiden TGF- β -Versuchsreihen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen, sodass eine Expression von Sox2 weder vor noch nach der Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2 detektierbar war.

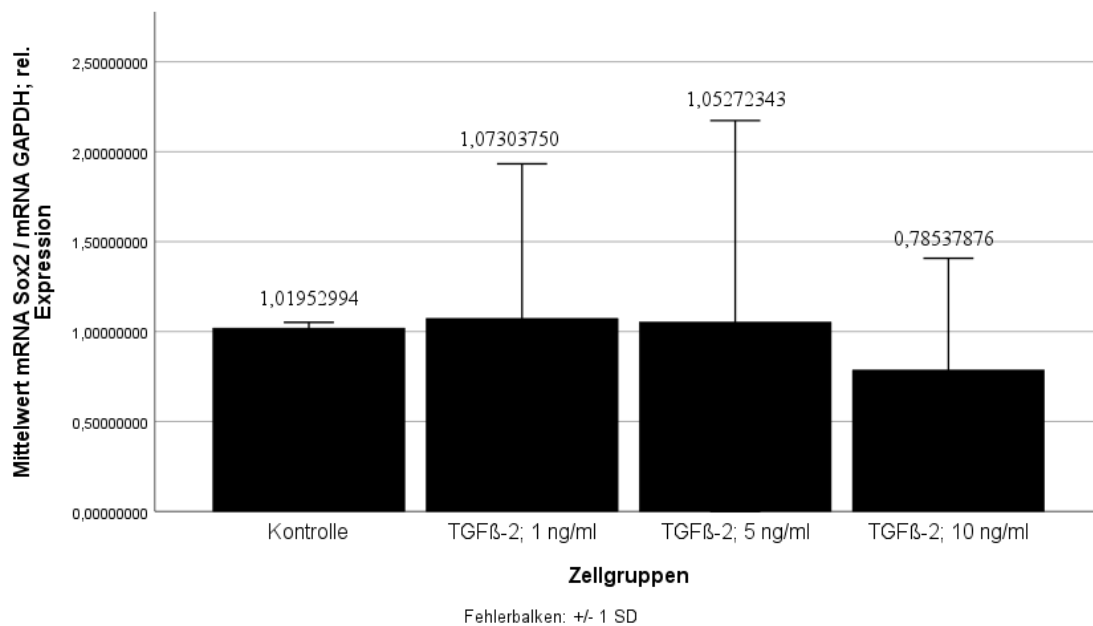


Abb. 2: Mittlere Expression von Sox2 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 2; 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von Sox2 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.1.3 Sox10

In beiden Versuchsreihen konnte in den unbehandelten HBVPs keine Expression von Sox10 detektiert werden. Die Teilversuche zeigten im Sinne eines fehlenden Nachweises einer Expression teilweise keine detektierten Ct-Werte.

In der TGF- β 1-Versuchsreihe war ein Teilversuch wegen zu hoher Differenzen der Ct-Werte der Kontrollgruppe zu den übrigen Zellgruppen der GAPDH-Referenzreihe in der qPCR nicht auswertbar und wurde von den Analysen ausgeschlossen. In einem weiteren Teilversuch wiesen zwei Behandlungszellgruppen Ct-Werte auf, die in der qPCR zu hohe Differenzen innerhalb und zwischen den Dupletts der Sox10-Test- und GAPDH-Referenzreihe zeigten. Für die Zellgruppe „TGF- β 1; 10 ng/ml“ zeigte sich dieses Problem in einem weiteren Teilversuch. Diese Ct-Werte lagen allesamt jedoch ohnehin unterhalb der Detektionsgrenze. Somit ergab sich in der TGF- β 1-Versuchsreihe für die Kontrolle ($m = 1,09$; $SD = 0,07$) und die behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 33,77$; $SD = 57,46$), „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 206,62$; $SD = 357,29$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 0,84$; $SD = 0,59$) für das statistische Testverfahren eine Versuchszahl von $n = 3$. Nach dem Shapiro-Wilk-Test lag für die Kontrolle und für die Zellgruppe „TGF- β 1; 10 ng/ml“ eine Normalverteilung vor ($p > 0,05$), nicht jedoch für die Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($p = 0,017$) und „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($p = 0,001$). Es lag keine Varianzhomogenität zwischen den Zellgruppen vor (Levene-Test; $p = 0,001$). Abschließend gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Zellgruppen in Bezug auf die nicht detektierbare Expression von Sox10, Welch-Test $F(3, 3,36) = 0,59$; $p = 0,658$. Auch der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen an, $H(3) = 0,44$; $p = 0,959$.

In der TGF- β 2-Versuchsreihe zeigten die Teilversuche überwiegend keine detektierten Ct-Werte, sodass in der qPCR weit unter der Detektionsgrenze kein Signal erfasst werden konnte. In einem einzigen Teilversuch zeigten die TGF- β 2-behandelten Zellgruppen der Konzentrationen 5 ng/ml und 10 ng/ml Ct-Werte innerhalb der Detektionsgrenze, die auf eine Erhöhung der Expression im Vergleich zur Kontrolle hindeuteten. Dies konnte jedoch nicht reproduziert werden. Vor diesem Hintergrund war zwar die Durchführung eines statistischen Tests nicht möglich, jedoch konnte ohnehin überwiegend keine Expression von Sox10 detektiert werden.

Wie bereits in den unbehandelten Zellen der Kontrolle konnte zusammengefasst auch in den behandelten HBVPs beider TGF- β -Versuchsreihen keine Expression von Sox10 detektiert werden. In der TGF- β 1-Versuchsreihe gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen.

3.1.1.4 Sox17

Eine Expression von Sox17 konnte weder in den unbehandelten noch in den mittels TGF- β 1 und TGF- β 2 behandelten HBVPs detektiert werden. In den meisten Versuchen der TGF- β 1-Versuchsreihe wie auch zum Teil in der TGF- β 2-Versuchsreihe konnte die qPCR keine Signale detektieren und somit keine Ct-Werte herausgeben. Dadurch lag in der TGF- β 2-Versuchsreihe die Versuchszahl hinsichtlich der verwendbaren Ergebnisse für die Teststatistik bei $n = 2$ für die Kontrolle ($m = 1,34$; $SD = 0,29$) sowie für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 1,00$; $SD = 0,07$), „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 3,55$; $SD = 2,66$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 1,97$; $SD = 0,14$). Diese war für eine statistische Berechnung zu niedrig. Zusammengefasst lagen die Ct-Werte der Sox17-Testreihe in sämtlichen unbehandelten und behandelten Zellgruppen beider Versuchsreihen kontinuierlich unter der Detektionsgrenze.

3.1.1.5 S100- β

Eine Expression von S100- β konnte in den unbehandelten und behandelten HBVPs beider TGF- β -Versuchsreihen nicht detektiert werden. In der GAPDH-Referenzreihe der qPCR lagen die Ct-Werte innerhalb und zwischen den Dupletts der Zellgruppen zwar mehrheitlich nah beieinander. In der S100- β -Testreihe beider TGF- β -Versuchsreihen dagegen wiesen die Ct-Werte innerhalb der Dupletts der Behandlungszellgruppen überwiegend höhere Differenzen auf, lagen aber dabei unterhalb der Detektionsgrenze. In beiden TGF- β -Versuchsreihen kamen neben eines fehlenden Nachweises einer zellulären S100- β -Expression somit häufig schwankende Ct-Werte vor, sodass der Großteil der Ergebnisse der S100- β -Testreihe statistisch nicht auswertbar war und die Berechnung einer Teststatistik nicht erfolgen konnte.

3.1.1.6 *CDH5*

Eine Expression von CDH5 konnte sowohl in den unbehandelten HBVPs als auch in den behandelten HBVPs beider TGF β -Versuchsreihen nicht detektiert werden. Die Ct-Werte der Zellgruppen wiesen innerhalb der Dupletts in den CDH5-Testreihen vereinzelt zwar höhere Differenzen auf und konnten somit nicht für die Berechnung einer Teststatistik genutzt werden. Jedoch lagen diese ohnehin konstant unterhalb der Detektionsgrenze. Außerdem gab die qPCR im Sinne eines fehlenden Signals häufig gar keine Ct-Werte heraus.

3.1.1.7 *Endoglin*

In beiden TGF β -Versuchsreihen zeigten sich in der qPCR überwiegend Ct-Werte, die entweder unterhalb oder nahe der Detektionsgrenze lagen. Somit konnte eine Expression von Endoglin in den unbehandelten und behandelten HBVPs größtenteils nicht oder allenfalls nur sehr gering ermittelt werden.

In der TGF- β 1-Versuchsreihe wurde ein Teilversuch im Vorfeld von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, weil dieser Unsicherheiten im Hinblick auf die Pipettierung zeigte. Dadurch lag die Versuchszahl der Kontrollgruppe ($m = 1,08$; $SD = 0,11$) und der behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 0,24$; $SD = 0,29$), „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 3,20$; $SD = 5,47$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 4,00$; $SD = 6,81$) bei $n = 3$. Für die Daten der Kontrollgruppe und der behandelten Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ lag eine Normalverteilung vor (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Die Daten der behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($p = 0,013$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($p = 0,018$) waren gemäß Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Der Levene-Test ergab keine Varianzhomogenität ($p = 0,004$). Schließlich konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen im Hinblick auf die nicht bis allenfalls nur sehr geringgradig detektierbare Expression von Endoglin festgestellt werden, Welch-Test $F(3, 3,58) = 5,58$; $p = 0,076$; $\text{part. } \eta^2 = 0,16$ (Abb. 3). Die Effektstärke war mit $f = 0,44$ hoch (136). Der Kruskal-Wallis-Test ergab ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen, $H(3) = 2,08$; $p = 0,610$.

In der TGF- β 2-Versuchsreihe mussten zwei Teilversuche gänzlich von der Auswertung ausgeschlossen werden, weil neben der Behandlungszellgruppe „TGF- β 2; 1 ng/ml“

jeweils auch die Kontrollen der Endoglin-Testreihe in der qPCR Ct-Werte innerhalb des Dupletts aufwiesen, die für eine aussagekräftige Auswertung zu weit auseinander lagen und deshalb eine Normalisierung der behandelten Zellgruppen auf die Kontrollgruppe nicht mehr möglich machten. Auch aus der Zellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ musste der Wert eines Teilversuchs ausgeschlossen werden, weil dieser ebenso Ct-Werte mit zu hoher Differenz innerhalb des Dupletts aufwies. Somit kam es für die Behandlungszellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 583,18$; $SD = 824,73$) zu einer Versuchszahl von $n = 2$. Die Versuchszahl der übrigen Zellgruppen „Kontrolle“ ($m = 1,00$; $SD = 0,003$), „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 0,69$; $SD = 0,92$) und „TGF- β 2, 5 ng/ml“ ($m = 557,33$; $SD = 964,45$) lag bei $n = 3$. Für die Daten der Kontrollgruppe und der Zellgruppe „TGF- β 2; 1 ng/ml“ lag Normalverteilung vor (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$), nicht jedoch für die Behandlungszellgruppe „TGF- β 2; 5 ng/ml“ (Shapiro-Wilk-Test, $p < 0,001$). Gemäß dem Levene-Test war zwischen den Zellgruppen keine Varianzhomogenität gegeben ($p = 0,002$). Schließlich wurden hinsichtlich der sehr gering detektierbaren Expression von Endoglin keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen der TGF- β 2-Versuchsreihe vorgefunden, Welch-Test $F(3, 2,50) = 0,51$; $p = 0,709$ (Abb. 4). Auch der Kruskal-Wallis-Test ergab hier keinen statistisch signifikanten Unterschied, $H(3) = 0,92$; $p = 0,860$. Das Ergebnis der Behandlungszellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ hatte aufgrund der niedrigen Versuchszahl eine zu niedrige Aussagekraft.

Zusammengefasst gab es in beiden TGF β -Versuchsreihen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen in Bezug auf die überwiegend nicht oder allenfalls nur sehr gering detektierte Expression von Endoglin.

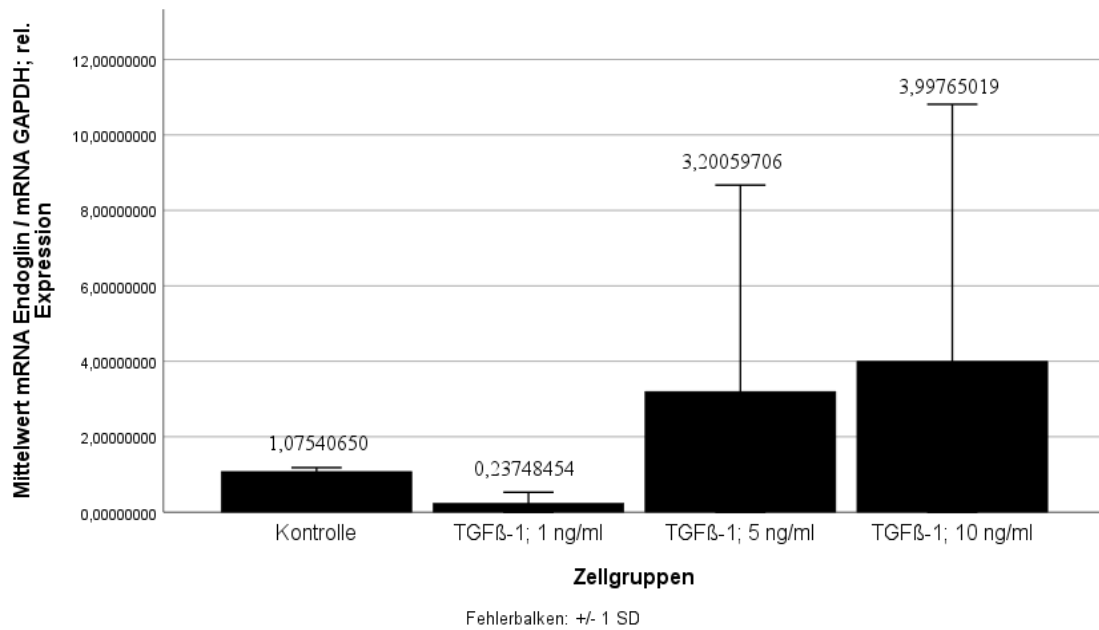


Abb. 3: Mittlere Expression von Endoglin relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β1, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung (m +/- 1 SD) der Expression von Endoglin in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle (n = 3; Welch-ANOVA; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

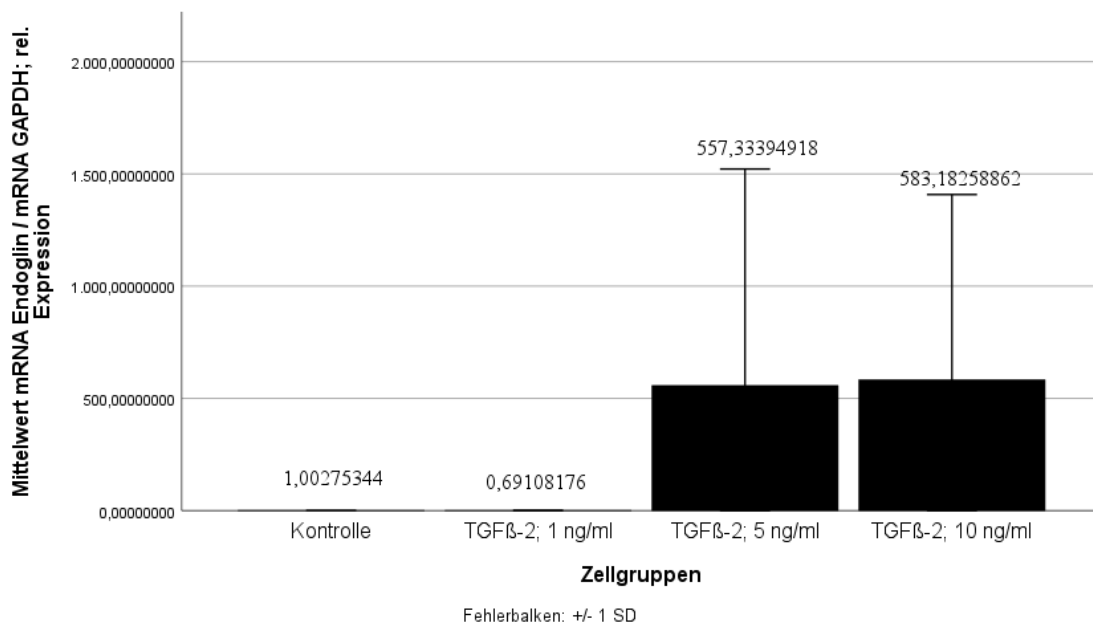


Abb. 4: Mittlere Expression von Endoglin relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β2; 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1 \text{ SD}$) der Expression von Endoglin in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 3$; n (TGF-β2; 10 ng/ml) = 2; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.1.8 Thrombomodulin (TM)

Sowohl in der TGF-β1- als auch in der TGF-β2-Versuchsreihe wurden in der qPCR Ct-Werte detektiert, die überwiegend unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Teilweise lagen hierbei die Ct-Werte auch innerhalb, zumeist jedoch in der Nähe der Detektionsgrenze. Demzufolge wurde eine Expression von TM in den unbehandelten und behandelten HBVPs beider TGF-β-Versuchsreihen zumeist nicht oder allenfalls nur geringgradig detektiert.

In der TGF-β1-Versuchsreihe wurde der Wert eines Teilversuchs aus der behandelten Zellgruppe „TGF-β1; 1 ng/ml“ von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, weil dessen Ct-Werte in der GAPDH-Referenzreihe der qPCR zu hohe Differenzen zu den Ct-Werten der übrigen Zellgruppen zeigten und folglich nicht auswertbar waren. Im selben Teilversuch konnten für die Zellgruppe „TGF-β1; 10 ng/ml“ keine Ct-Werte ermittelt werden, weil die qPCR im Sinne eines fehlenden Nachweises keine Signale detektieren konnte.

In einem weiteren Teilversuch konnte die qPCR für sämtliche Behandlungsgruppen weder Signale detektieren noch auswertbare Ct-Werte herausgeben. Aufgrund dieser überwiegenden Anzahl negativer Ergebnisse ergab sich für die Kontrolle ($m = 1,01$; $SD = 0,02$) eine Versuchszahl von $n = 3$, für die behandelte Zellgruppen „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 88,60$; $SD = 125,24$) ein $n = 2$ und für die übrigen Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 0,97$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 0,09$) ein $n = 1$. Wegen dieser niedrigen Versuchszahlen konnten keine aussagekräftigen, statistischen Tests vorgenommen werden.

In der Versuchsreihe von TGF- β 2 mussten in einem Teilversuch die Werte aus den Zellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ und „TGF- β 2; 5 ng/ml“ von der Auswertung ausgeschlossen werden, weil die Ct-Werte innerhalb der Dupletts der TM-Testreihe zu weit auseinander lagen und nicht auswertbar waren. In einem weiteren Teilversuch konnte die qPCR für die Zellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ im Sinne eines fehlenden Nachweises keine Signale detektieren und keine auswertbaren Ct-Werte hervorbringen. Ein weiterer Teilversuch wurde wegen schlechter Pipettierung ausgeschlossen. Schließlich resultierte für die Kontrollgruppe ($m = 1,12$; $SD = 0,04$) eine Versuchszahl von $n = 3$ und für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 0,04$; $SD = 0,06$), „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($m = 0,13$; $SD = 0,18$) und „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 0,03$; $SD = 0,04$) eine Versuchszahl von $n = 2$. Diese Versuchszahl war für eine aussagekräftige Teststatistik zu niedrig.

Zusammengefasst konnte sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten HBVPs überwiegend keine bis allenfalls nur eine geringe Expression von TM in beiden TGF β -Versuchsreihen detektiert werden. Die Versuchszahlen waren für eine aussagekräftige Teststatistik in beiden Versuchsreihen zu niedrig.

3.1.1.9 Flk-1

In beiden TGF- β -Versuchsreihen konnte sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Perizyten überwiegend keine Expression von flk-1 detektiert werden.

In der TGF- β 1-Versuchsreihe musste aus der Behandlungszellgruppe der Konzentration 1 ng/ml der Wert eines Teilversuchs ausgeschlossen werden, da dessen Ct-Werte innerhalb der GAPDH-Referenzreihe in der qPCR zu den übrigen Zellgruppen eine zu hohe Differenz zeigten und deshalb nicht auswertbar waren. Somit ergab sich in der TGF- β 1-Versuchsreihe für die Kontrolle ($m = 1,00$; $SD = 0,005$) und für die behandelten

Zellgruppen „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 1,13$; $SD = 0,75$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 0,42$; $SD = 0,30$) eine Versuchszahl von $n = 3$, jedoch nur $n = 2$ für „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 1,15$; $SD = 0,48$). Gemäß dem Shapiro-Wilk-Test lag für die Daten der Kontrolle und der Zellgruppe „TGF- β 1; 10 ng/ml“ eine Normalverteilung vor ($p > 0,05$). Die Daten der Gruppe „TGF- β 1; 5 ng/ml“ waren nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test; $p = 0,046$). Es lag keine gruppenübergreifende Varianzhomogenität vor (Levene-Test, $p = 0,011$). Zwischen den getesteten Zellgruppen gab es hinsichtlich der Expression von flk-1 keine statistisch signifikanten Unterschiede, Welch-Test $F(3, 2,50) = 2,64$; $p = 0,250$ (Abb. 5). Auch der Kruskal-Wallis-Test ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede, $H(3) = 4,85$; $p = 0,194$. In der flk-1-Testreihe der qPCR lagen die Ct-Werte der TGF- β 1-behandelten Zellgruppen wie bereits bei den unbehandelten Zellen weiterhin überwiegend unterhalb der Detektionsgrenze, sodass nach wie vor kein flk-1 detektiert werden konnte. Das Ergebnis der Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ hatte aufgrund der zu niedrigen Versuchszahl eine unzureichende Aussagekraft.

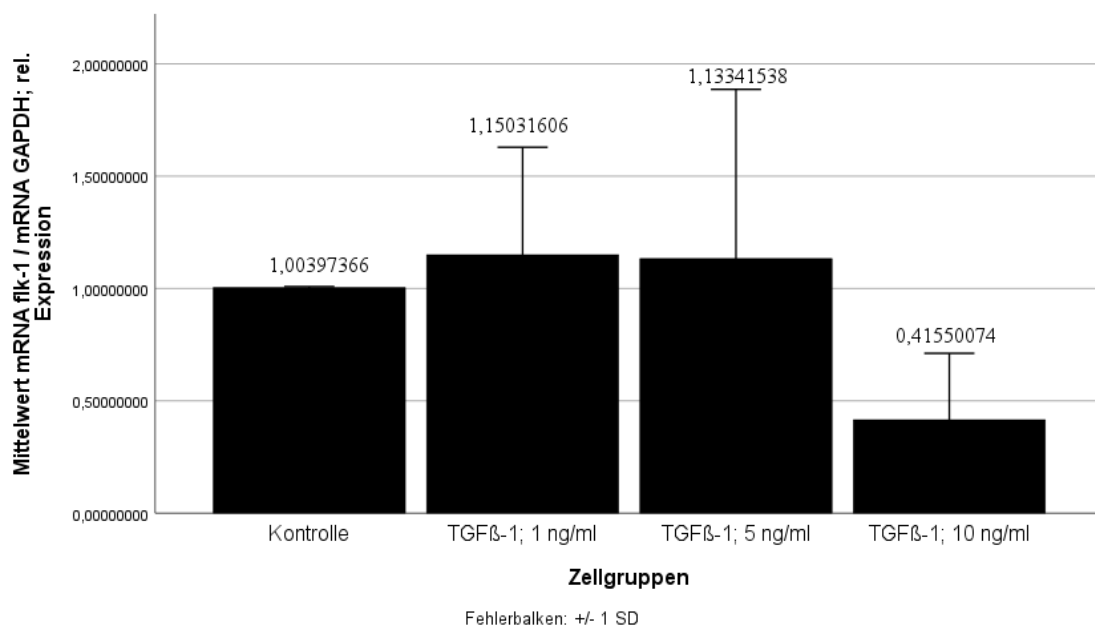


Abb. 5: Mittlere Expression von flk-1 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1 SD$) der Expression von flk-1 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 3$; n (TGF- β 1; 1 ng/ml) = 2; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

In der TGF- β 2-Versuchsreihe musste ein Teilversuch komplett von den weiteren Analysen ausgeschlossen werden, weil in der qPCR die Ct-Werte der einzelnen Behandlungszellgruppen innerhalb der Dupletts zu hohe Differenzen aufwiesen. Außerdem musste aus den Behandlungszellgruppen von „TGF- β 2; 1 ng/ml“ und „TGF- β 2; 5 ng/ml“ jeweils der Wert eines Teilversuchs ausgeschlossen werden, weil auch hier die Ct-Werte in der flk-1-Testreihe innerhalb der Dupletts der Behandlungszellgruppen zu weit auseinander lagen. Infolgedessen lag die Versuchszahl in der Kontrollgruppe ($m = 1,01$; $SD = 0,02$) und in der Zellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 0,24$; $SD = 0,21$) bei $n = 3$ und in den Gruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 0,54$; $SD = 0,03$) und „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($m = 0,26$; $SD = 0,36$) bei $n = 2$. Die Kontrollgruppe und die Zellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Gemäß Levene-Test lag aber keine Varianzhomogenität vor ($p = 0,003$). Schließlich gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Zellgruppen bezüglich der Mittelwerte von flk-1, Welch-Test $F(3, 2,36) = 98,95$, $p = 0,005$, $\eta^2 = 0,836$ (Abb. 6). Der Post-hoc-Test nach Dunnett-T3 zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungszellgruppe „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($p = 0,016$). Zwar nahm hierbei der Durchschnittswert der Expression von flk-1 in den mittels 1 ng/ml behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle statistisch um ca. 0,48 ab (95%-CI [-0,71; -0,24]) und die errechnete Effektstärke unter Berücksichtigung des partiellen Eta-Quadrat $\eta^2 = 0,836$ war mit $f = 2,26$ zwar hoch (136). Jedoch waren die Versuchszahlen der Behandlungszellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ und „TGF- β 2; 5 ng/ml“ mit $n = 2$ zu niedrig, sodass dieses Ergebnis unzureichend aussagekräftig war. Außerdem lagen in der qPCR die Ct-Werte der unbehandelten sowie behandelten Zellgruppen der flk-1-Testreihe überwiegend bei über 30 Zyklen und somit zwar in der Nähe, jedoch formal unterhalb der Detektionsgrenze, sodass eine Expression nicht detektiert werden konnte.

Zusammengefasst gab es zwischen den Zellgruppen der TGF- β 1-Versuchsreihe keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der TGF- β 2-Versuchsreihe waren die Versuchszahlen der mittels 1 ng/ml und 5 ng/ml behandelten Zellgruppen zu niedrig für ein aussagekräftiges Ergebnis. Auch die Zellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ergab nach Dunnett-T3 keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Allerdings konnte sowohl in den unbehandelten als auch in den TGF- β -behandelten HBVPs beider Versuchsreihen ohnehin keine Expression von flk-1 detektiert werden.

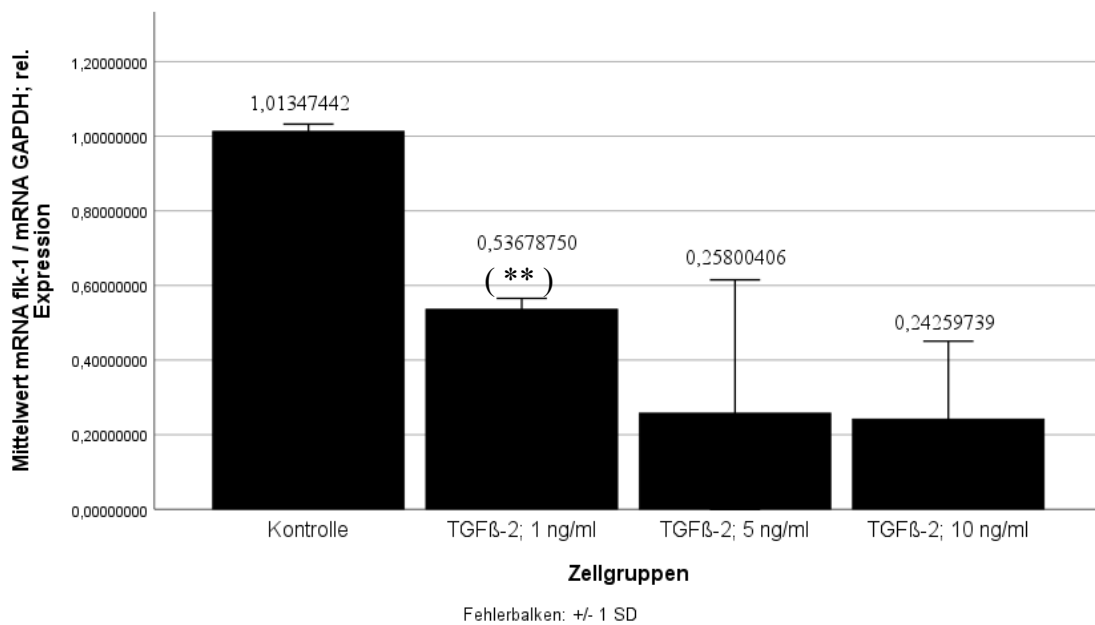


Abb. 6: Mittlere Expression von *flk-1* relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β2; 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von *flk-1* in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; n (TGF-β2; 1 ng/ml) = n (TGF-β2; 5 ng/ml) = 2; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.1.10 CD31

In den unbehandelten sowie TGF-β-behandelten HBVPs beider Versuchsreihen konnte überwiegend keine Expression von CD31 detektiert werden.

In der TGF-β1-Versuchsreihe lagen die ermittelten Ct-Werte der CD31-Testreihe in der qPCR unterhalb der Detektionsgrenze. Teilweise konnte die qPCR im Sinne eines fehlenden Nachweises keine Signale erfassen und gab deshalb keine Ct-Werte heraus. Anhand der ermittelten qPCR-Ergebnisse kam es zwar für die behandelten Zellgruppen „TGF-β1; 1 ng/ml“ ($m = 0,93$; $SD = 0,01$) und „TGF-β1; 10 ng/ml“ ($m = 0,48$; $SD = 0,004$) für das statistische Testverfahren nur zu einer anwendbaren Versuchszahl von $n = 2$ und für „TGF-β1; 5 ng/ml“ ($m = 2,80$) zu $n = 1$, jedoch lagen auch diese Ct-Werte ohnehin unterhalb der Detektionsgrenze. Somit konnte einerseits unter Einbeziehung aller Ergebnisse bei einer Versuchszahl von insgesamt $n = 3$ für die Kontrollgruppe ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) und für die mittels TGF-β1 behandelten Zellgruppen zwar keine Teststatistik berechnet

werden. Andererseits konnte jedoch ohnehin keine Expression von CD31 detektiert werden.

Auch in der TGF- β 2-Versuchsreihe lagen in der qPCR die ermittelten Ct-Werte der unbehandelten und TGF- β -behandelten Zellgruppen überwiegend unterhalb der Detektionsgrenze. Nur in einem einzigen Teilversuch konnte CD31 ausschließlich in der Kontrollgruppe detektiert werden. Ein anderer Teilversuch wies in der qPCR für eine Auswertung zwar zu hohe Differenzen der Ct-Werte innerhalb der Dupletts der CD31-Testreihe auf. Hierbei lagen die Ct-Werte jedoch ohnehin unterhalb der Detektionsgrenze. Die Anzahl der anwendbaren Versuche für die Teststatistik lag somit für die Kontrolle ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) und für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 14,96$; $SD = 24,93$), „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($m = 87,85$; $SD = 150,83$) und „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 14,83$; $SD = 25,13$) bei $n = 3$. Nur die Daten der Kontrolle waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Gemäß Shapiro-Wilk-Test lag für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($p = 0,043$), „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($p = 0,010$) und „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($p = 0,024$) keine Normalverteilung und auch keine Varianzhomogenität vor (Levene-Test; $p = 0,002$). Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen hinsichtlich der zumeist nicht detektierbaren Expression von CD31, Welch-Test $F(3, 3,33) = 0,68$; $p = 0,617$. Auch laut Kruskal-Wallis-Test gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Zellgruppen, $H(3) = 0,74$; $p = 0,901$.

Zusammengefasst konnte in den unbehandelten und behandelten HBVPs keine Expression von CD31 detektiert werden. Dabei konnten in der TGF- β 2-Versuchsreihe bezüglich der Expression von CD31 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen gezeigt werden.

3.1.2 Exprimierte Marker und ihre Veränderungen infolge der Behandlung

3.1.2.1 PDGFR- β

In sämtlichen unbehandelten und behandelten HBVPs konnte eine Expression von PDGFR- β detektiert werden.

In der Datenreihe von TGF- β 1 musste aus der Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ jeweils der Wert aus zwei Teilversuchen von der Gesamtauswertung ausgeschlossen werden, da

deren Ct-Werte in der qPCR innerhalb der GAPDH-Referenzreihe eine zu hohe Differenz zu den Ct-Werten der übrigen Zellgruppen aufwiesen und deshalb nicht auswertbar waren. Es ergab sich für die Kontrolle ($m = 1,01$; $SD = 0,004$) und für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 36,63$; $SD = 71,74$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 1,88$; $SD = 1,22$) eine Versuchszahl von $n = 4$ und für „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 0,88$; $SD = 0,45$) eine Versuchszahl von $n = 2$. Der Shapiro-Wilk-Test attestierte für die Kontrolle und für die Zellgruppe „TGF- β 1; 10 ng/ml“ eine Normalverteilung ($p > 0,05$), nicht jedoch für „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($p = 0,001$). Zwischen den Zellgruppen bestand keine Varianzhomogenität (Levene-Test; $p = 0,008$). Die Welch-ANOVA ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen im Hinblick auf die Expression von PDGFR- β , Welch-Test $F(3, 3,00) = 0,746$; $p = 0,592$ (Abb. 7). Auch der Kruskal-Wallis-Test ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede, $H(3) = 1,09$; $p = 0,813$. Das Ergebnis der Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ hatte aufgrund der niedrigen Versuchszahl von $n = 2$ eine zu niedrige Aussagekraft.

In der TGF- β 2-Versuchsreihe lag die Versuchszahl für die Kontrollgruppe ($m = 1,01$; $SD = 0,02$) und für die Behandlungsgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 1,05$; $SD = 0,39$), „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($m = 38,31$; $SD = 72,61$) und „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 13,67$; $SD = 24,28$) bei $n = 4$. Die Daten der Kontrollgruppe und der behandelten Zellgruppe „TGF- β 2; 1 ng/ml“ waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test; $p > 0,05$). Die Daten der Zellgruppen „TGF- β 2; 5 ng/ml“ (Shapiro-Wilk-Test, $p = 0,002$) und „TGF- β 2; 10 ng/ml“ (Shapiro-Wilk-Test, $p = 0,003$) waren dagegen nicht normalverteilt. Laut dem Levene-Test bestand zwischen den Zellgruppen keine Varianzhomogenität ($p = 0,005$). Hinsichtlich der Expression von PDGFR- β gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen, Welch-Test $F(3, 5,01) = 0,576$; $p = 0,655$; (Abb. 8). Auch gemäß dem Kruskal-Wallis-Test gab es zwischen den Zellgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede, $H(3) = 6,09$; $p = 0,099$.

Zusammengefasst lag zwischen den Zellgruppen weder in der TGF- β 1- noch in der TGF- β 2-Versuchsreihe ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von PDGFR- β vor.

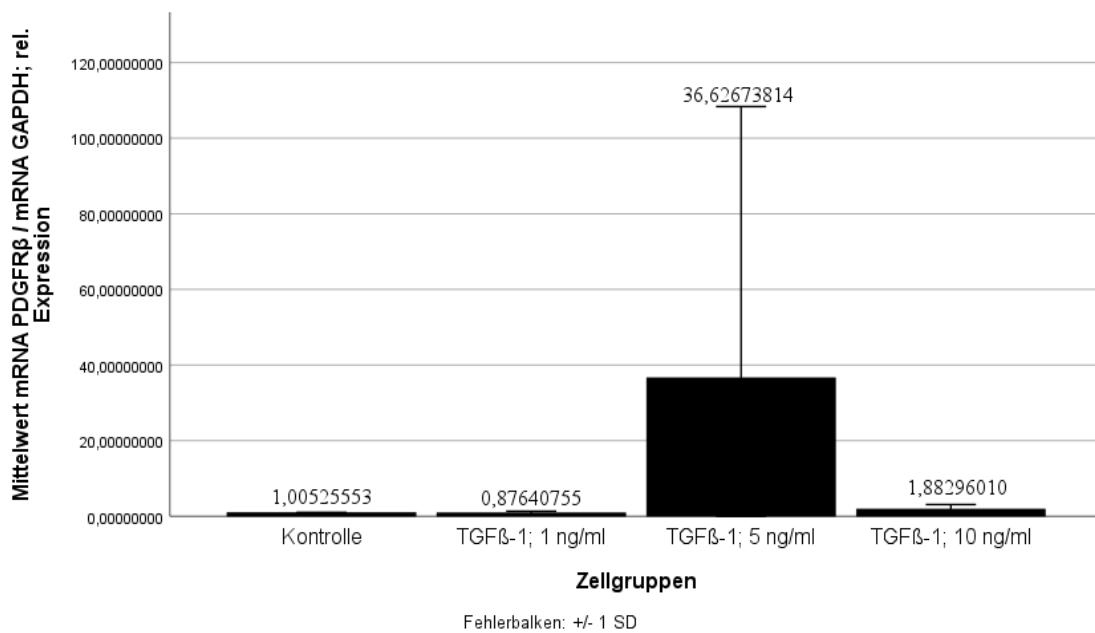


Abb. 7: Mittlere Expression von PDGFR- β relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von PDGFR- β in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; n (TGF- β 1; 1 ng/ml) = 2; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

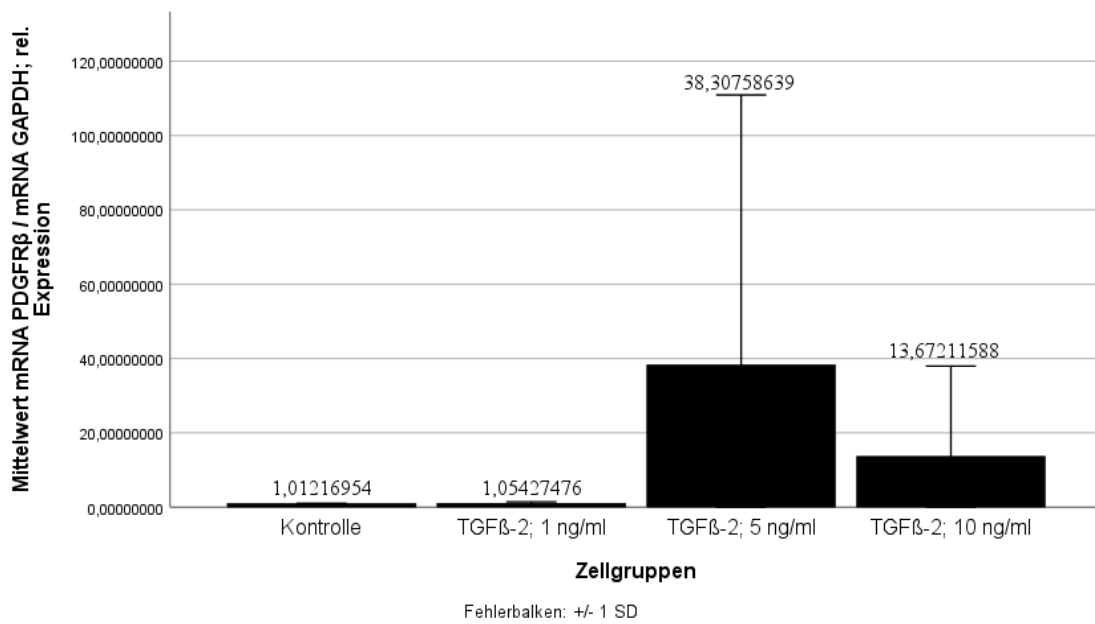


Abb. 8: Mittlere Expression von PDGFR-β relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β2, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1 \text{ SD}$) der Expression von PDGFR-β in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.2.2 CSPG4

In der TGF-β1- und TGF-β2-Versuchsreihe lagen die in der qPCR detektierten Ct-Werte zumeist nahe der Detektionsgrenze. Dabei zeigte sich in beiden Versuchsreihen sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Zellen überwiegend keine bis allenfalls nur eine sehr geringe Expression von CSPG4.

In der TGF-β1-Versuchsreihe musste aus der Zellgruppe der mittels 1 ng/ml TGF-β1 behandelten HBVPs der Wert eines Teilversuchs von der Gesamtauswertung ausgeschlossen werden, weil die Ct-Werte innerhalb der GAPDH-Referenzreihe der qPCR zu hohe Differenzen zu den Ct-Werten der übrigen Zellgruppen aufwiesen und deshalb nicht auswertbar waren. Außerdem mussten zwei andere Teilversuche aufgrund der zu hohen Differenzen der Ct-Werte der Kontrolle zu den Ct-Werten der übrigen Zellgruppen in der GAPDH-Referenzreihe und wegen Unsicherheiten in Bezug auf die Pipettierung als Ganzes ausgeschlossen werden. Die auswertbaren Zellgruppen der Kontrolle ($m = 1,02$; SD

= 0,02) und der behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 0,36$; $SD = 0,07$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 0,45$; $SD = 0,11$) wiesen eine Versuchszahl von $n = 3$ auf und zeigten eine Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Die Versuchszahl der Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 0,70$; $SD = 0,08$) lag bei $n = 2$. Zwischen diesen Zellgruppen lag Varianzhomogenität vor (Levene-Test, $p > 0,05$). Nach der Welch-ANOVA lag ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von CSPG4 zwischen den Zellgruppen der TGF- β 1-Versuchsreihe vor, Welch-Test $F(3, 2,82) = 70,15$, $p = 0,004$, $\eta^2 = 0,951$ (Abb. 9). Der Post-hoc-Test nach Dunnett-T zeigte jeweils einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($p = 0,006$), „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($p < 0,001$) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($p < 0,001$). Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nahm die durchschnittliche Expression von CSPG4 in den TGF- β 1-behandelten Zellen der Gruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ (-0,33; 95%-CI [-0,53, -0,12]), „TGF- β 1; 5 ng/ml“ (-0,66; 95%-CI [-0,85, -0,48]) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ (-0,58; 95%-CI [-0,76, -0,39]) signifikant ab. Die errechnete Effektstärke f unter Berücksichtigung des partiellen Eta-Quadrat $\eta^2 = 0,951$ ergab $f = 4,41$ und somit eine hohe Effektstärke (136). Die Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ hatte aufgrund der niedrigen Versuchszahl von $n = 2$ hinsichtlich des Ergebnisses nur eine eingeschränkte Aussagekraft.

In der TGF- β 2-Versuchsreihe musste ein Teilversuch als Ganzes von der Auswertung ausgeschlossen werden, da die Ct-Werte der verschiedenen Zellgruppen, u.a. der Kontrollgruppe, innerhalb der GAPDH-Referenzreihe der qPCR zu hohe Differenzen zueinander aufwiesen und deshalb nicht auswertbar waren. Ebenso musste aus der behandelten Zellgruppe „TGF- β 2; 5 ng/ml“ der Wert eines Teilversuchs ausgeschlossen werden, weil in der CSPG4-Testreihe die Ct-Werte innerhalb des Dupletts für eine Auswertung zu weit auseinander lagen. Für die Kontrollgruppe ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) und für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 0,63$; $SD = 0,58$) und „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 39,02$; $SD = 67,43$) lag eine Versuchszahl von $n = 3$ vor. Für die Zellgruppe „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($m = 62,22$; $SD = 87,80$) lag die Versuchszahl bei $n = 2$. Die Daten waren für die Kontrollgruppe und für die behandelte Zellgruppe „TGF- β 2; 1 ng/ml“ normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$), nicht jedoch für die Zellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ (Shapiro-Wilk-Test, $p < 0,001$). Nach dem Levene-Test lag keine gruppenübergreifende Varianzhomogenität vor ($p < 0,001$). Abschließend zeigten sich keine statistisch

signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen der TGF- β 2-Versuchsreihe hinsichtlich der Expression von CSPG4, Welch-Test $F(3, 2,50) = 0,70$; $p = 0,622$ (Abb. 10). Auch der Kruskal-Wallis-Test ergab hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede, $H(3) = 1,21$; $p = 0,799$. Das Ergebnis der Zellgruppe „TGF- β 2; 5 ng/ml“ hatte wegen der niedrigen Versuchszahl von $n = 2$ eine unzureichende Aussagekraft.

Zusammengefasst lag bezüglich der Expression von CSPG4 jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellgruppen der TGF- β 1-Versuchsreihe vor. Dabei kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Abnahme der ohnehin sehr basalen Expression von CSPG4 in allen TGF- β 1-behandelten Zellgruppen. Die ermittelte Effektstärke war hoch. Dagegen zeigte sich zwischen den Zellgruppen der TGF- β 2-Versuchsreihe kein statistisch signifikanter Unterschied.

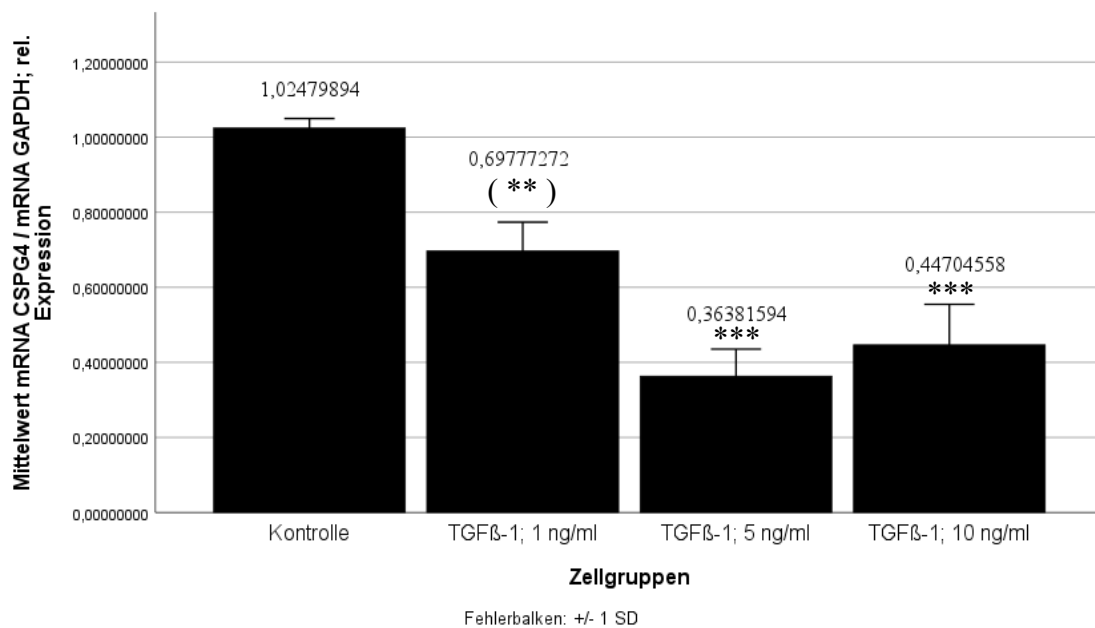


Abb. 9: Mittlere Expression von CSPG4 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1; 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von CSPG4 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 3$; n (TGF- β 1; 1 ng/ml) = 2; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

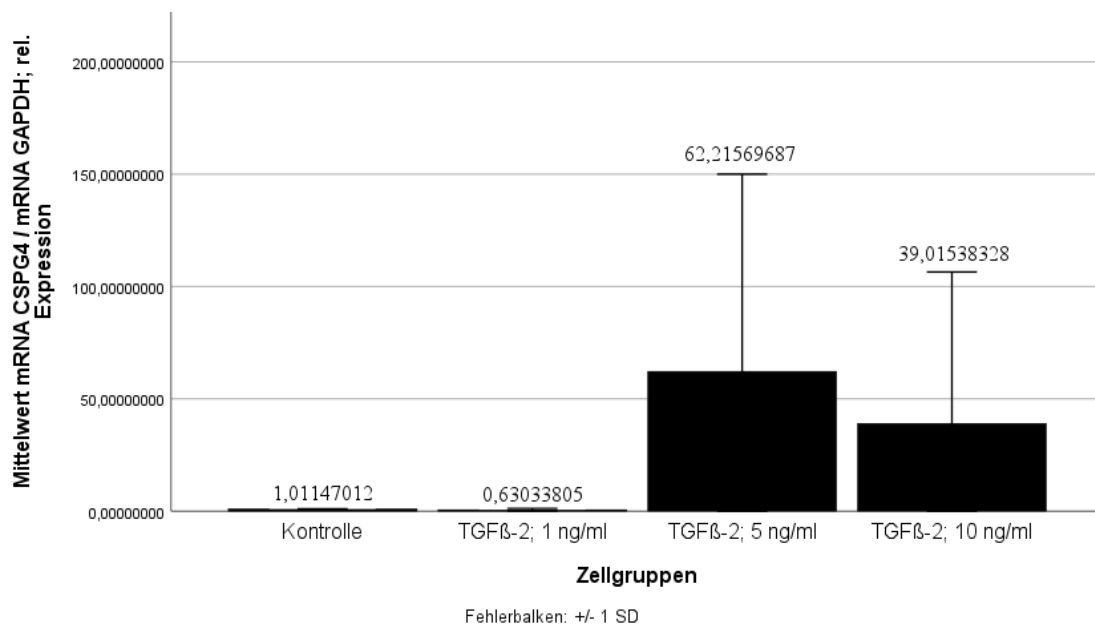


Abb. 10: Mittlere Expression von CSPG4 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β2, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1 \text{ SD}$) der Expression von CSPG4 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 3$; n (TGF-β2, 5 ng/ml) = 2; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.2.3 CD146

In sämtlichen unbehandelten sowie behandelten HBVPs konnte eine Expression von CD146 detektiert werden.

In der TGF-β1-Datenreihe musste aus der behandelten Zellgruppe „TGF-β1; 1 ng/ml“ jeweils der Wert aus zwei Teilversuchen ausgeschlossen werden, da deren Ct-Werte innerhalb der GAPDH-Referenzreihe der qPCR eine zu hohe Differenz zu den Ct-Werten der übrigen Zellgruppen aufwiesen und daher nicht auswertbar waren. Die Zellgruppen der Kontrolle ($m = 1,02$; $\text{SD} = 0,03$) und der Behandlung der Konzentrationen 5 ng/ml ($m = 1,27$; $\text{SD} = 0,52$) und 10 ng/ml ($m = 1,71$; $\text{SD} = 0,85$) wiesen eine Versuchszahl von $n = 4$ auf. Die Versuchszahl der behandelten Zellgruppe „TGF-β1; 1 ng/ml“ ($m = 1,67$; $\text{SD} = 0,19$) lag bei $n = 2$. Während die Daten der Behandlungsgruppen „TGF-β1; 5 ng/ml“ und „TGF-β1; 10 ng/ml“ normalverteilt waren (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$), lag für die Kontrollgruppe, die aber ohnehin auf 1 normalisiert wurde, keine Normalverteilung vor

(Shapiro-Wilk-Test, $p = 0,006$). Zwischen den Gruppen war gemäß dem Levene-Test Varianzhomogenität gegeben ($p > 0,05$). Zwischen den Zellgruppen der TGF- β 1-Versuchsreihe gab es keine signifikanten Unterschiede in der Expression von CD146, Welch-Test $F(3, 3,04) = 6,40$; $p = 0,079$; part. $\eta^2 = 0,28$ (Abb. 11). Die Effektstärke f unter Berücksichtigung des partiellen Eta-Quadrat $\eta^2 = 0,28$ ergab $f = 0,62$ und war hoch (136). Die Versuchszahl von $n = 2$ der Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ war für ein aussagekräftiges Ergebnis zu niedrig.

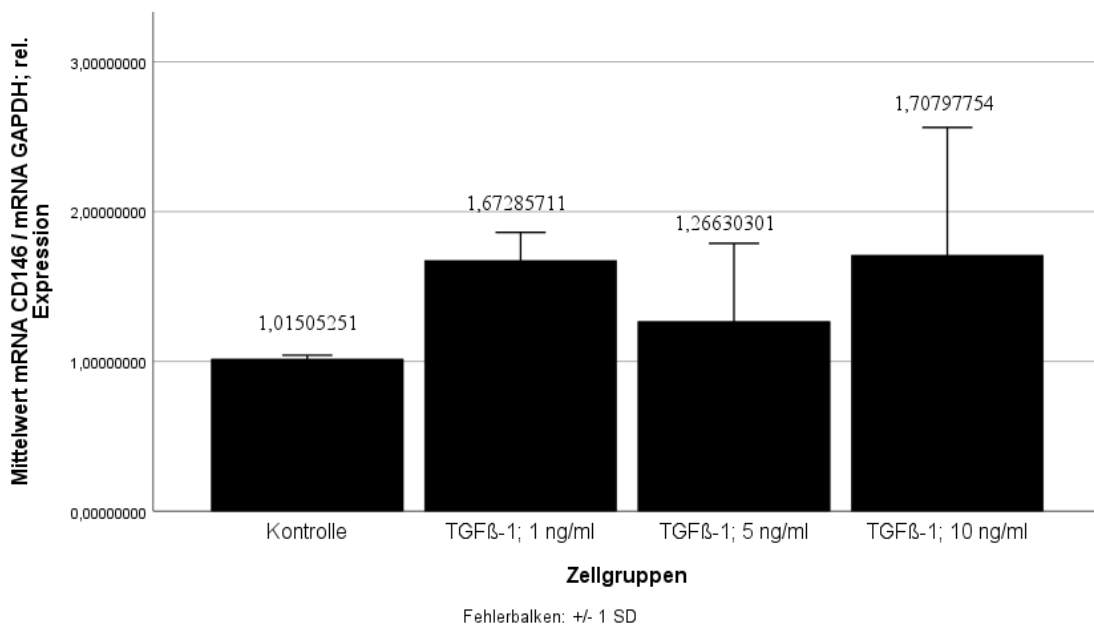


Abb. 11: Mittlere Expression von CD146 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1; 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von CD146 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; n (TGF- β 1; 1 ng/ml) = 2; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

In der TGF- β 2-Versuchsreihe lag für die Kontrolle ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) und für die behandelten Zellgruppen der Konzentrationen 1 ng/ml ($m = 1,09$; $SD = 0,40$), 5 ng/ml ($m = 2,06$; $SD = 1,87$) und 10 ng/ml ($m = 1,03$; $SD = 0,57$) eine Versuchszahl von $n = 3$ vor. Die Daten der Zellgruppe „TGF β ; 1 ng/ml“ waren nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p = 0,049$). Dagegen war Normalverteilung für die übrigen Zellgruppen gegeben (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Laut Levene-Test lag keine Varianzhomogenität vor ($p =$

0,009). Zwischen den Zellgruppen der TGF- β 2-Versuchsreihe gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Expression von CD146, Welch-Test $F(3, 3,34) = 0,26$; $p = 0,854$ (Abb. 12). Der Kruskal-Wallis-Test ergab für die Expression ebenso keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen, $H(3) = 1,15$; $p = 0,806$.

Zusammengefasst gab es in beiden TGF- β -Versuchsreihen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellgruppen in der Expression von CD146.

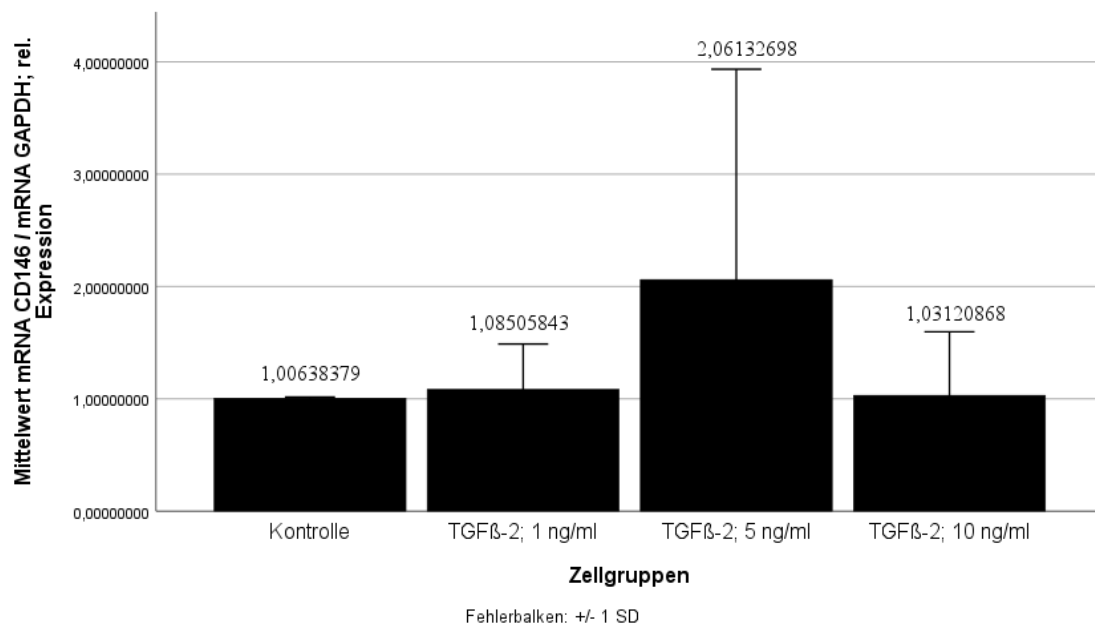


Abb. 12: Mittlere Expression von CD146 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 2, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwert mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von CD146 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 3$; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.2.4 C-myc

In sämtlichen unbehandelten sowie mittels TGF- β 1 und TGF- β 2 behandelten HBVPs konnte eine Expression von c-myc detektiert werden.

In der TGF- β 1-Versuchsreihe musste im Vorfeld aus der Behandlungszellgruppe „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ein auffälliger Wert, der rechnerisch als Ausreißer identifiziert wurde, von

der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden. Dieser Wert verhielt sich im Vergleich zu den Werten der anderen Teilversuche unerwartet gegenläufig. Seine Differenz zum Mittelwert aller Werte war größer als das Fünffache des Durchschnittswerts der Standardabweichungen aller Teilversuche dieser Messreihe und durfte deshalb ausgeschlossen werden. Auch aus der behandelten Zellgruppe „TGF- β 1; 1 ng/ml“ musste der Wert eines Teilversuchs ausgeschlossen werden, weil die Ct-Werte in der GAPDH-Referenzreihe der qPCR zu hohe Differenzen zu den Ct-Werten der übrigen Zellgruppen aufwiesen und daher nicht auswertbar waren. Aus demselben Grund musste ein weiterer Teilversuch als Ganzes ausgeschlossen werden, weil hierbei von der beschriebenen Problematik mit den Ct-Wert-Differenzen die Kontrollzellgruppe betroffen und deshalb eine Auswertung nicht mehr möglich war. Für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ ($m = 0,53$; $SD = 0,30$) und „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($m = 0,19$; $SD = 0,03$) resultierte somit eine Versuchszahl von $n = 3$. Die Versuchszahl der Kontrollzellgruppe ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) und der behandelten Zellgruppe „TGF- β 1; 10 ng/ml“ ($m = 0,33$; $SD = 0,29$) lag bei $n = 4$. Für die Daten der TGF- β 1-Versuchsreihe lag für jede Zellgruppe Normalverteilung vor (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Nach dem Levene-Test war jedoch keine Varianzhomogenität vorhanden ($p = 0,012$). Gemäß der Welch-ANOVA gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Zellgruppen in Bezug auf die Expression von c-myc, Welch-Test $F(3, 4,03) = 531,08$; $p < 0,001$; part. $\eta^2 = 0,768$ (Abb. 13). Der Post-hoc-Test nach Dunnett-T3 ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und der behandelten Zellgruppe „TGF- β 1; 5 ng/ml“ ($p < 0,001$). Hierbei nahm die durchschnittliche Expression von c-myc in den behandelten Zellen relativ zur Expression in den unbehandelten Kontrollzellen signifikant ab ($-0,82$; 95%-CI $[-0,93; -0,71]$). Die errechnete Effektstärke f unter Berücksichtigung des partiellen Eta-Quadrat $\eta^2 = 0,768$ ergab $f = 1,82$ und somit eine hohe Effektstärke (136).

In der TGF- β 2-Versuchsreihe musste im Vorfeld ein Teilversuch als Ganzes ausgeschlossen werden, weil in der GAPDH-Referenzreihe der qPCR zwischen den Zellgruppen höhere Differenzen der Ct-Werte vorlagen und eine Auswertung deshalb nicht möglich war. Folglich wiesen die Kontrollgruppe ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) und die behandelten Zellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 1,11$; $SD = 0,23$), „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($m = 1,14$; $SD = 0,40$) und „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 0,77$; $SD = 0,37$) eine Versuchszahl von $n = 4$ auf. Die Daten waren für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 2; 1 ng/ml“ und „TGF- β 2; 10

ng/ml“ normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Für die Zellgruppe „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($p = 0,009$) und die Kontrollgruppe ($p = 0,005$) bestand dagegen laut Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung. Varianzhomogenität war vorhanden (Levene-Test; $p > 0,05$). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zellgruppen der TGF- β 2-Versuchsreihe in der Expression von c-myc, Welch-Test $F(3, 5,01) = 0,76$; $p = 0,562$ (Abb. 14). Auch der Kruskal-Wallis-Test ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, $H(3) = 3,57$; $p = 0,333$.

Zusammengefasst existierte ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zellgruppen der TGF- β 1-Versuchsreihe in Bezug auf die Expression von c-myc. Der Post-hoc-Test nach Dunnett-T3 zeigte hierbei eine signifikante Abnahme der durchschnittlichen Expression von c-myc in den mittels 5 ng/ml TGF- β 1 behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Effektstärke war hoch. Dagegen konnte zwischen den Zellgruppen der TGF- β 2-Versuchsreihe kein signifikanter Unterschied in der Expression von c-myc festgestellt werden.

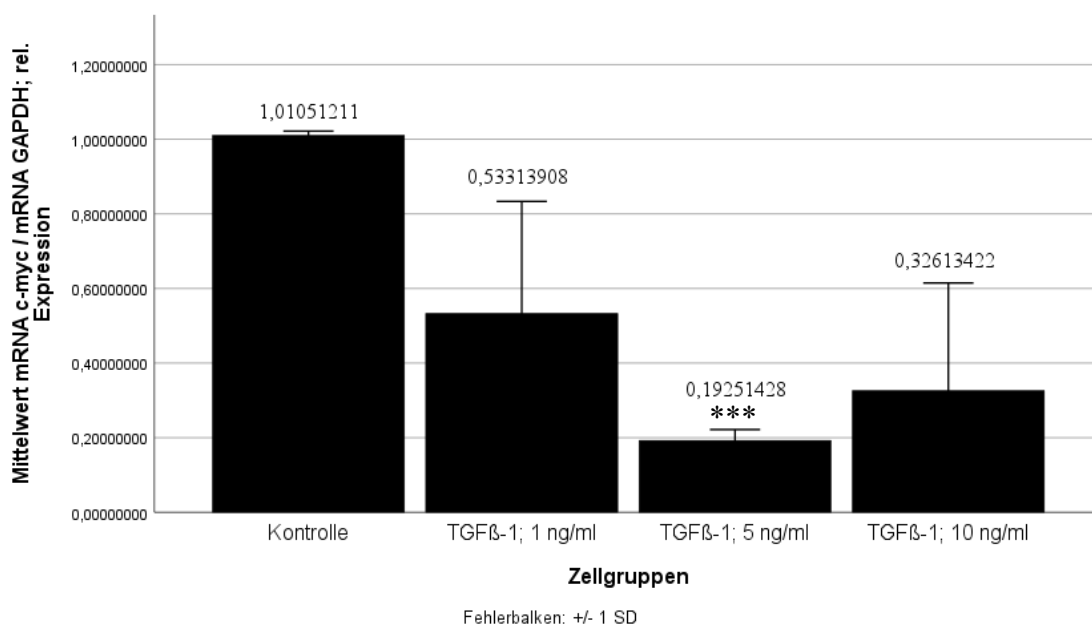


Abb. 13: Mittlere Expression von c-myc relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von c-myc in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; n (TGF- β 1; 1 ng/ml) = n (TGF- β 1; 5 ng/ml) = 3; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

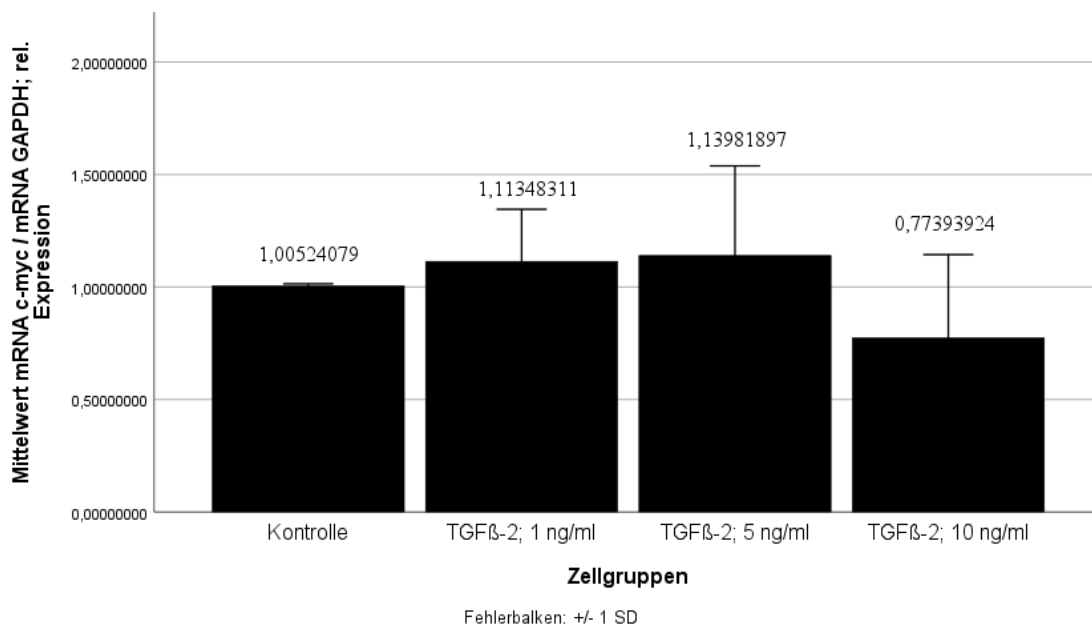


Abb. 14: Mittlere Expression von c-myc relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β2, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1 \text{ SD}$) der Expression von c-myc in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.2.5 Klf4

Sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten HBVPs konnte überwiegend eine Expression von Klf4 detektiert werden.

In der Versuchsreihe von TGF-β1 musste der Wert eines Teilversuchs aus der behandelten Zellgruppe „TGF-β1; 1 ng/ml“ von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden, weil dessen Ct-Werte innerhalb der GAPDH-Referenzreihe der qPCR eine zu hohe Differenz zu den Ct-Werten der übrigen Zellgruppen aufwiesen und daher nicht auswertbar waren. Aus demselben Grund war ein anderer Teilversuch als Ganzes nicht auswertbar und wurde ausgeschlossen, weil hierbei von derselben Problematik in der GAPDH-Referenzreihe die Kontrollgruppe betroffen und deshalb keine Auswertung mehr möglich war. Außerdem fiel in der Behandlungszellgruppe „TGF-β1; 10 ng/ml“ ein weiterer Wert auf, der sich im Vergleich zu den Werten der anderen Teilversuche unerwartet gegenläufig verhielt, rechnerisch nach demselben Schema wie der Ausreißer der Zellgruppe „TGF-

β1; 5 ng/ml“ der c-myc-Testreihe (s. o.) als Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen wurde. Dadurch resultierte für die Kontrolle ($m = 1,01$; $SD = 0,02$) und für die Behandlungszellgruppe „TGF-β1; 5 ng/ml“ ($m = 0,36$; $SD = 0,19$) eine Versuchszahl von $n = 4$ und für die behandelten Zellgruppen „TGF-β1; 1 ng/ml“ ($m = 0,81$; $SD = 0,58$) und „TGF-β1; 10 ng/ml“ ($m = 0,37$; $SD = 0,22$) eine Versuchszahl von $n = 3$. Bis auf die Kontrolle ($p = 0,011$) wiesen die Zellgruppen der TGF-β1-Datenreihe laut Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung auf ($p > 0,05$). Außerdem lag zwischen diesen Zellgruppen laut Levene-Test Varianzhomogenität vor ($p > 0,05$). Hierbei gab es zwischen den verschiedenen Zellgruppen einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Expression von Klf4, Welch-Test $F(3, 3,78) = 17,29$; $p = 0,011$; $\eta^2 = 0,572$ (Abb. 15). Das Post-hoc-Testverfahren nach Dunnett-T deckte jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen „TGF-β1; 5 ng/ml“ ($p = 0,029$) und „TGF-β1; 10 ng/ml“ ($p = 0,045$) auf. Dabei nahm die Expression von Klf4 sowohl in den mittels 5 ng/ml ($-0,65$; 95%-CI $[-1,23; -0,07]$) als auch 10 ng/ml ($-0,64$; 95%-CI $[-1,27; -0,02]$) TGF-β1-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab. Unter Verwendung des partiellen Eta-Quadrat $\eta^2 = 0,572$ ergab sich mit $f = 1,16$ eine hohe Effektstärke (136).

In der TGF-β2-Versuchsreihe musste ein Teilversuch als Ganzes von der Auswertung ausgeschlossen werden, weil in der GAPDH-Referenzreihe der qPCR die Ct-Werte der Zellgruppen zu hohe Differenzen zueinander zeigten und eine Auswertung nicht möglich war. Dadurch zeigte sich sowohl für die Kontrollgruppe ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) als auch für die behandelten Zellgruppen „TGF-β2; 1 ng/ml“ ($m = 1,20$; $SD = 0,45$), „TGF-β2; 5 ng/ml“ ($m = 0,92$; $SD = 0,81$) und „TGF-β2; 10 ng/ml“ ($m = 0,70$; $SD = 0,63$) eine Versuchszahl von $n = 3$. Diese Daten waren für alle Zellgruppen normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Außerdem lag laut Levene-Test eine Gleichheit der Varianzen zwischen den Zellgruppen vor ($p > 0,05$). Dabei gab es hinsichtlich der Expression von Klf4 zwischen den Zellgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede, Welch-Test $F(3, 3,34) = 0,31$; $p = 0,816$ (Abb. 16).

Zusammengefasst lag in der Versuchsreihe von TGF-β1 bezüglich der Expression von Klf4 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zellgruppen vor, wobei der Post-hoc-Test nach Dunnett-T eine signifikante Abnahme der Expression in den TGF-β1-behandelten Zellgruppen der Konzentrationen 5 ng/ml und 10 ng/ml im Vergleich zur

Kontrolle zeigte. Die Effektstärke war hoch. Im Gegensatz dazu wies die Versuchsreihe von TGF- β 2 allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

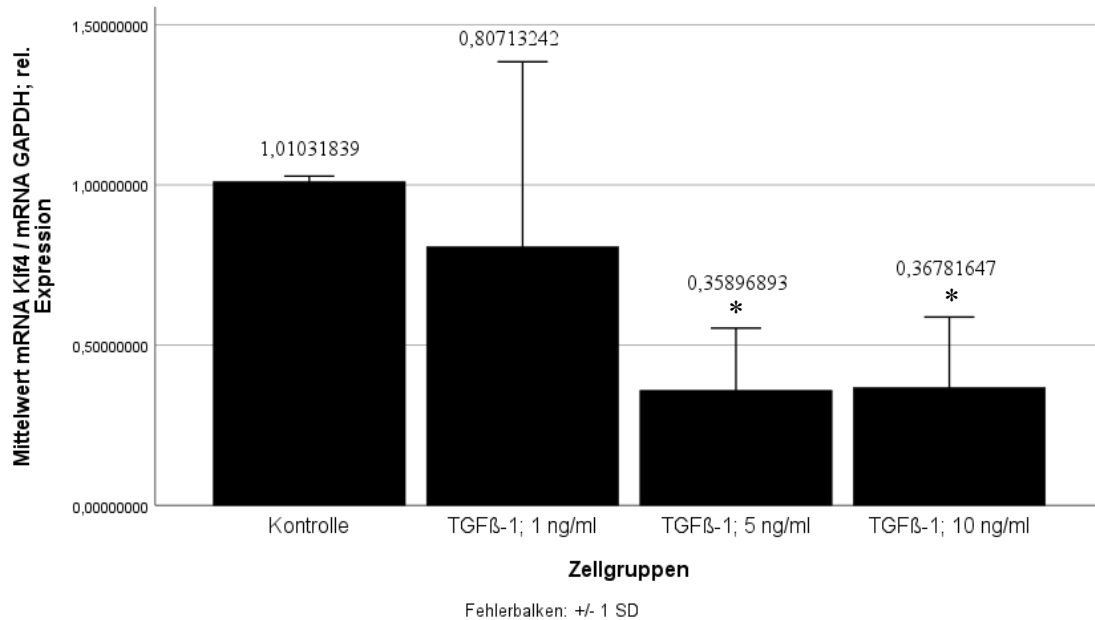


Abb. 15: Mittlere Expression von *Klf4* relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von *Klf4* in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; n (TGF- β 1; 1 ng/ml) = n (TGF- β 1; 10 ng/ml) = 3; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

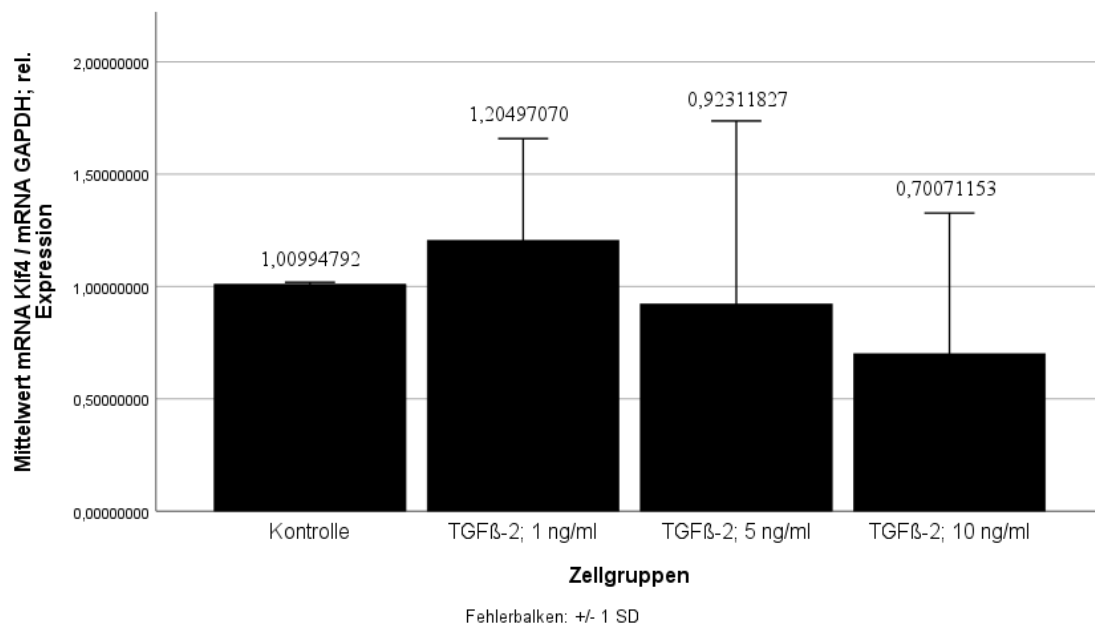


Abb. 16: Mittlere Expression von *Klf4* relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β2; 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von *Klf4* in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 3$; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.2.6 VCAM-1

In sämtlichen unbehandelten und behandelten HBVPs der TGF-β1- und TGF-β2-Versuchsreihe konnte eine Expression von VCAM-1 detektiert werden.

In der Versuchsreihe von TGF-β1 musste im Vorfeld der Wert eines Teilversuchs aus der behandelten Zellgruppe „TGF-β1; 1 ng/ml“ von der Auswertung ausgeschlossen werden, weil dessen Ct-Werte innerhalb der GAPDH-Referenzreihe der qPCR eine zu hohe Differenz zu den Ct-Werten der anderen Zellgruppen zeigten und deshalb nicht auswertbar waren. Innerhalb desselben Teilversuchs wurde ein im Vergleich zu den übrigen Teilversuchen auffälliger Wert der Zellgruppe „TGF-β1; 5 ng/ml“ rechnerisch nach demselben Prinzip wie bereits in der c-myc- und *Klf4*-Testreihe (s.o.) als Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen. Dadurch ergab sich eine Versuchszahl von $n = 4$ für die Kontrolle ($m = 1,01$; $SD = 0,01$) und für die Zellgruppe „TGF-β1; 10 ng/ml“ ($m = 0,11$; $SD = 0,17$). Für die Zellgruppen „TGF-β1; 1 ng/ml“ ($m = 0,14$; $SD = 0,09$) und „TGF-β1; 5 ng/ml“ ($m =$

0,03; SD = 0,01) lag die Versuchszahl bei $n = 3$. Der Shapiro-Wilk-Test attestierte für die Kontrolle und für die behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ und „TGF- β 1; 5 ng/ml“ eine Normalverteilung ($p > 0,05$). Die Annahme der Normalverteilung musste jedoch für „TGF- β 1; 10 ng/ml“ abgelehnt werden (Shapiro-Wilk-Test; $p = 0,015$). Gemäß dem Levene-Test bestand außerdem keine gruppenübergreifende Varianzhomogenität ($p = 0,023$). Schließlich existierte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zellgruppen in der Expression von VCAM-1, Welch-Test $F(3, 4,86) = 3612,03$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,957$ (Abb. 17). Der Post-hoc-Test nach Dunnett-T3 zeigte jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrolle und allen behandelten Zellgruppen. Dabei nahm die Expression von VCAM-1 in den behandelten Zellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ (-0,87; $p = 0,011$; 95%-CI [-1,27, -0,46]), „TGF- β 1; 5 ng/ml“ (-0,98; $p < 0,001$; 95%-CI [-1,01, -0,95]) und „TGF- β 1; 10 ng/ml“ (-0,90, $p = 0,007$; 95%-CI [-1,35, -0,45]) im Mittel relativ zur Kontrolle ab. Mit $f = 4,72$ konnte eine hohe Effektstärke ermittelt werden (136). Auch der Kruskal-Wallis-Test ergab bezüglich der Expression von VCAM-1 einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Zellgruppen, $H(3) = 9,71$; $p = 0,004$.

In der Versuchsreihe von TGF- β 2 wurde der Wert eines Teilversuchs aus der Zellgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ von der Auswertung ausgeschlossen, weil dessen Ct-Werte innerhalb des qPCR-Dupletts der VCAM-1-Testreihe zu weit auseinander lagen und deshalb nicht auswertbar waren. Die erreichte Versuchszahl lag für die Kontrolle ($m = 1,04$; SD = 0,05), für „TGF- β 2; 1 ng/ml“ ($m = 1,09$; SD = 0,78) und „TGF- β 2; 5 ng/ml“ ($m = 0,81$; SD = 0,51) bei $n = 4$ und für „TGF- β 2; 10 ng/ml“ ($m = 0,48$; SD = 0,50) bei $n = 3$. Die Daten sämtlicher Zellgruppen waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > 0,05$). Außerdem lag zwischen den Zellgruppen Varianzhomogenität vor (Levene-Test, $p > 0,05$). Schließlich gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgruppen in Bezug auf die Expression von VCAM-1, Welch-Test $F(3, 4,34) = 1,17$; $p = 0,420$ (Abb. 18).

Zusammengefasst lag in der TGF- β 1-Versuchsreihe im Hinblick auf die Expression von VCAM-1 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und sämtlichen, behandelten Zellgruppen vor. Hierbei zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine

Abnahme der Expression mit hoher Effektstärke in den TGF- β 1-behandelten Zellen. Die TGF- β 2-Versuchsreihe zeigte dagegen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

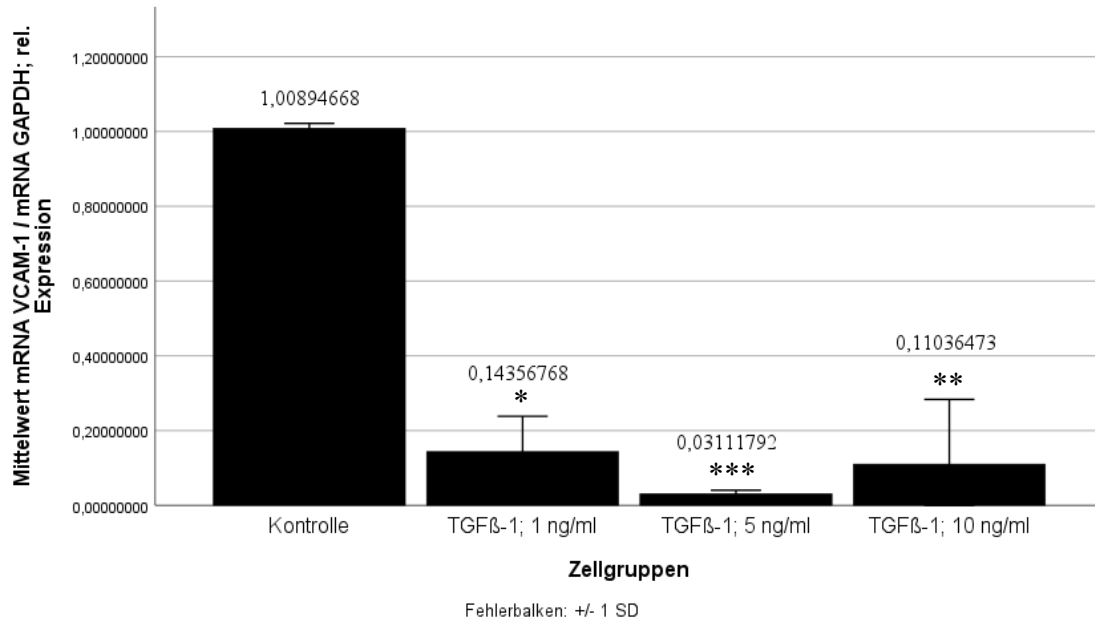


Abb. 17: Mittlere Expression von VCAM-1 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF- β 1

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF- β 1 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF- β 1; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF- β 1, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF- β 1; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1$ SD) der Expression von VCAM-1 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; n (TGF- β 1; 1 ng/ml) = n (TGF- β 1; 5 ng/ml) = 3; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

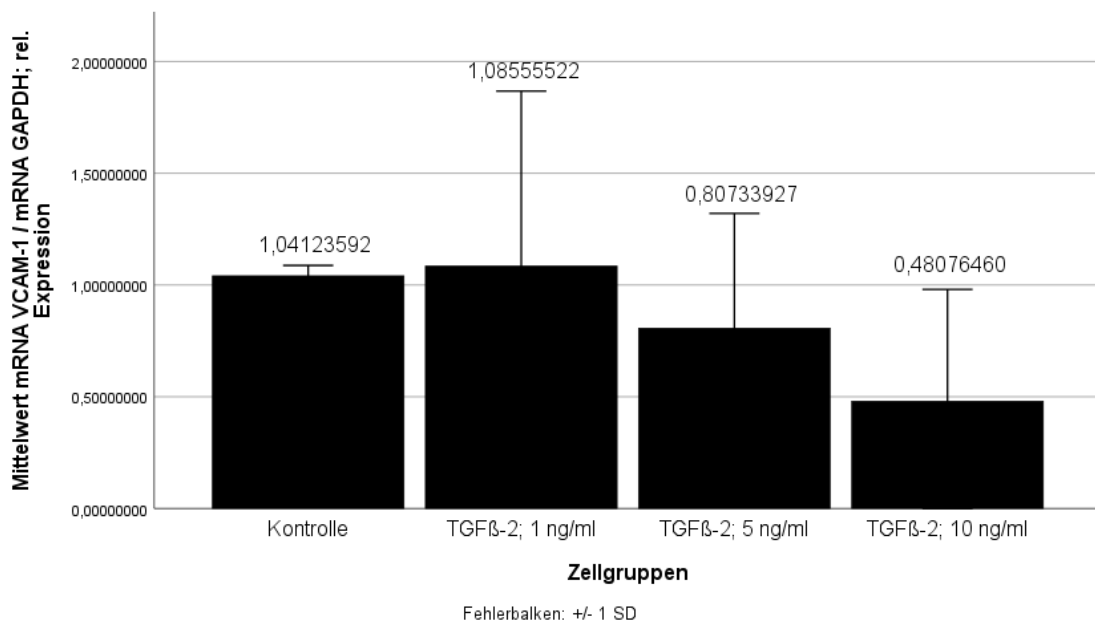


Abb. 18: Mittlere Expression von VCAM-1 relativ zur Kontrolle nach 18h Behandlung mit TGF-β2

Perizyten (HBVPs) wurden auf Zellkulturplatten kultiviert und anschließend 18 h lang mit TGF-β2 bei einer Konzentration von 1 ng/ml (TGF-β2; 1 ng/ml), 5 ng/ml (TGF-β2, 5 ng/ml) und 10 ng/ml (TGF-β2; 10 ng/ml) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Perizyten, deren Ausgangsexpression auf 1 normalisiert wurde. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung ($m \pm 1 \text{ SD}$) der Expression von VCAM-1 in den behandelten Perizyten relativ zur Kontrolle ($n = 4$; n (TGF-β2; 10 ng/ml) = 3; Welch-ANOVA; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4 Diskussion

Das GBM ist der häufigste maligne Hirntumor und hat eine ungünstige Prognose (1). Die derzeitige Standardtherapie aus kombinierter Radiochemotherapie nach Stupp et al. verbessert die Zwei-Jahres-Überlebensrate auf 26,5%, während die mediane Überlebenszeit ca. 13 bis 17 Monate beträgt (7). Seine vielfältigen, biologischen Eigenschaften wie die hohe Proliferationsrate, das infiltrative Wachstum, die Neigung zur Nekrosebildung und die hohe Vaskularisation bzw. Tumor-Angiogenese des GBM erschweren die Therapie (2-4, 19). Einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt stellen hierbei die zellulären Bestandteile der BBB dar, da das bildgebungstechnisch sichtbare Hirnödem auf einen Funktionsverlust der BBB im GBM hindeutet (29, 35, 36). Zu den Zellen der BBB gehören auch Perizyten (38), die unter hypoxischen Bedingungen multipotente Stammzeleigenschaften annehmen können und daher das Potenzial haben, bei Bedarf zelluläre Bestandteile der BBB zu produzieren (46, 47). Außerdem werden diese Zellen im Tumorgeschehen durch das GBM selbst beeinflusst und zu einem tumorfördernden Zelltyp verändert (48). Dort im GBM-Milieu herrscht ausgeprägte Hypoxie (29, 30) und verschiedene, tumorfördernde Zytokine wie TGF- β 1 und - β 2 kommen meistens in hohen Konzentrationen vor (76). Neben hypoxischen Verhältnissen (51) kann auch TGF- β unter bestimmten Umständen in Zellen EMT induzieren (60, 61). Zu den EMT-auslösenden Transkriptionsfaktoren, die im Gliom eine wichtige Rolle spielen, gehören die Faktoren namens SNAIL, SLUG und TWIST (51). Die Expression von SLUG und TWIST hängt dabei mit dem Grad der Tumor-Angiogenese im Gliom zusammen, sodass stärker vaskularisierte Gliome wie das GBM eine höhere Expression dieser beiden EMT-Regulatoren aufweisen. SLUG und TWIST werden dabei von Tumorgefäß-assoziierten Perizyten bzw. Gefäßwandzellen der von Mäder et al. als sekundäre GBM mit IDH-Mutationsstatus, WHO-Grad 4, eingestuft Hirntumore exprimiert (77). TGF- β induziert die Expression von SLUG in den GBM-assoziierten Perizyten, wodurch morphologische Veränderungen dieser Zellen hervorgerufen und die Zellproliferation sowie Zellmotilität erhöht werden. Dies weist darauf hin, dass GBM-Zellen durch die Sekretion von TGF- β benachbarte Perizyten verändern und so auch Einfluss auf die Tumor-Angiogenese nehmen (78). Weil bekannt ist, dass Perizyten unter hypoxischen Bedingungen Stammzeleigenschaften annehmen sowie eine Transdifferenzierung zu Zellen verschiedenen Zelltyps durchlaufen

können (46, 47) und TGF- β in Perizyten die Expression des EMT-Transkriptionsfaktors SLUG induzieren kann (78), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob TGF- β dadurch eine Dedifferenzierung der Perizyten und eine Transdifferenzierung in endotheliale Zelltypen auslösen kann. Zu diesem Zweck wurde die Expression verschiedener, perizytärer Zellmarker, Stammzellmarker und endothelialer Zellmarker vor und nach der Behandlung mit TGF- β untersucht, um daraus Rückschlüsse auf das TGF- β -induzierte Differenzierungsverhalten der Perizyten zu ziehen.

4.0 Limitationen des Studiendesigns

In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente mittels qPCR anfällig für Pipettierfehler, weil die Proben der Zellgruppen in Dupletts pipettiert wurden. Um die Versuchsdurchführung robuster gegen Pipettierfehler zu machen, sollten diese Experimente nach Möglichkeit in Tripletts durchgeführt werden. Dieses Procedere erhöht die Sicherheit der Durchführung, setzt aber mehr Zeit und mehr Probenmaterial voraus, weshalb dies in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war.

Drei Versuchsreihen wiesen in der GAPDH-Referenzreihe kontinuierlich in sämtlichen Marker-Testreihen zu hohe Differenzen der Ct-Werte einzelner Zellgruppen zueinander auf und waren deshalb nicht auswertbar. In diesen Versuchen deuteten die Ergebnisse auf eine genaue Pipettierung der qPCR-Platte selbst hin, weil die Ct-Werte innerhalb der einzelnen Dupletts selbst nah beieinander lagen. Stattdessen lagen die Differenzen der Ct-Werte hierbei zwischen den Dupletts der Zellgruppen, weshalb die Ursache auf Mengenunterschiede in den verwendeten cDNA-Proben zurückzuführen ist. Es ist wahrscheinlich, dass die verwendeten cDNA-Proben der jeweiligen betroffenen Zellgruppen im Vergleich zu den Proben der übrigen Zellgruppen eine niedrigere Konzentration aufwiesen. Ursächlich könnte zum einen eine fehlerhaft hergestellte cDNA-Lösung oder das cDNA-Syntheseverfahren selbst sein, in der die jeweiligen RNA-Proben möglicherweise nicht ordnungsgemäß gemessen oder gelöst wurden. Um diesem Problem entgegenzuwirken, sollten zur Testung der Qualität die cDNA-Proben im Vorfeld mittels qPCR einem Testdurchlauf unterzogen werden. Hierbei bietet sich eine kurze qPCR mit einem Haushaltsgen an, um sicherzustellen, dass die Konzentrationen der verwendeten cDNA-Proben zwischen den Zellgruppen ähnlich sind und nicht voneinander abweichen.

Allgemein ist es sinnvoll, möglichst hohe Versuchszahlen bzw. große Stichproben zu erheben. Zur Durchführung einer aussagekräftigen Teststatistik sollten die Versuchszahlen bei mindestens $n = 3$ liegen, damit auch Marker-Testreihen wie die von TM statistisch getestet und die Aussagekraft der Ergebnisse einzelner Zellgruppen und Marker-Testreihen ohne signifikantes Ergebnis, jedoch mit hoher, relevanter Effektstärke, erhöht werden können.

Da die verwendeten Primer für S100- β und RGS5 in der vorliegenden Arbeit nicht verlässlich funktioniert haben, sollten für diese Marker andere Primer verwendet werden.

Zudem wurden die HBVPs in der vorliegenden Arbeit in nicht-synchronisierten Zellzyklusphasen behandelt. Zwar führt TGF- β 1 auch in nicht-synchronisierten Zellen zu einer EMT. Dennoch ist laut Studien die Wirkung von TGF- β abhängig von der vorliegenden Zellzyklusphase. Um dies nachzuweisen, haben Studien Zellgruppen im Vorfeld jeweils einmal auf die G1/S-Phase und G2/M-Phase synchronisiert und nach anschließender Behandlung mit TGF- β 1 untereinander und zusätzlich mit nicht-synchronisierten, behandelten Zellen verglichen. Demnach führt TGF- β 1 in Zellen der G1/S-Phase zu einer EMT und in Zellen der G2/M-Phase zu einer Apoptose (61). Daher sollten zur Optimierung des Studiendesigns die Perizyten vor der Behandlung auf die G1/S-Phase synchronisiert werden.

4.1 Keine Dedifferenzierung der HBVPs und keine EMT durch alleinige Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2

4.1.1 Keine Dedifferenzierung der TGF- β -behandelten Perizyten bei fehlender Herabregulation perizytärer Zellmarker

In der vorliegenden Studie lag in den HBVPs eine Expression von PDGFR- β und CD146 bereits vor der Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2 vor. Die Behandlung mit TGF- β hatte hierbei keinen signifikanten Einfluss und es kam zu keiner Herabregulation. Die Ergebnisse zu den TGF- β 1-behandelten Zellgruppen der Konzentration 1 ng/ml in der CD146- und PDGFR- β -Testreihe waren jedoch aufgrund zu niedriger Versuchszahl jeweils unzureichend aussagekräftig. Ein signifikanter Effekt durch TGF- β 1 auf die Expression von CD146 ist bei höherer Versuchszahl wegen der gemessenen, hohen Effektstärke, die auf einen relevanten Effekt hindeutet, nicht auszuschließen. Dabei deuten die Mittelwerte der

Expression in den behandelten Zellgruppen darauf hin, dass eine höhere Versuchszahl zum Ergebnis einer statistisch signifikanten Hochregulation von CD146 durch TGF- β 1 führen könnte (Abb. 11). Weil CD146 als Ko-Rezeptor von VEGFR-2 mit Tumor-Angiogenese assoziiert ist (137, 138), wäre das in diesem Fall ein Hinweis auf eine angiogene Wirkung von TGF- β 1.

CSPG4 konnte in den Perizyten teilweise allenfalls nur im Sinne einer sehr niedrigen Expression nachgewiesen werden. Hier zeigte sich infolge der Behandlung mit TGF- β 1 eine statistisch signifikante Herabregulation in allen behandelnden Konzentrationen, wobei das Ergebnis für die Zellgruppe „TGF- β 1; 1ng/ml“ aufgrund der zu niedrigen Versuchszahl bei dennoch vorliegender Vergleichbarkeit zu den übrigen Zellgruppen eingeschränkt aussagekräftig war (Abb. 9). Unter der Annahme einer ohnehin sehr niedrigen Expression kam es daher zu einer weiteren, signifikanten Senkung der Expression von CSPG4 durch TGF- β 1. Die hohe Effektstärke spricht hierbei für einen relevanten Effekt, der bei vorhandener, niedriger Expression auf eine deutliche Herabregulation hinweist.

Des Weiteren konnte eine Expression von RGS5 dagegen nicht nachgewiesen werden, obwohl aus der Literatur bekannt ist, dass eine Expression in den HBVPs vorliegt (139). Deshalb kann vor dem Hintergrund, dass die Ct-Werte der GAPDH-Referenzreihe eine korrekte Pipettierung aufzeigten, davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Primer nicht ordnungsgemäß funktionierten. Daher waren diese Ergebnisse nicht aussagekräftig.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Dedifferenzierung der TGF- β -behandelten Perizyten.

4.1.2 TGF- β -induzierte, perizytäre EMT möglicherweise nur bei bestimmtem Expressionsmuster, einschließlich bestimmter Isoformen von CSPG4/NG2

Als perizytärer Marker wird das Transmembranprotein CSPG4 (82) im GBM von Perizyten proliferativ aktiver Tumorgefäße im Rahmen der Tumor-Angiogenese exprimiert (90) und korreliert dabei mit dem Malignitätsgrad von Gliomen (89). Die Hemmung von CSPG4/NG2 führt im GBM zu einer reduzierten Tumor-Angiogenese und zu einer Abnahme des Tumorödems (140). Daher spricht die fehlende Hochregulation und die weitere, TGF- β 1-induzierte Herabregulation von CSPG4/NG2 bei einer allenfalls niedrigen

Ausgangsexpression gegen eine Transdifferenzierung proliferativer Perizyten als Beitrag zur Tumor-Angiogenese (Abb. 9). Da jedoch viele, verschiedene Isoformen von NG2 existieren und im GBM nur bestimmte Varianten exprimiert sind (141), besteht die Möglichkeit, dass TGF- β nur auf bestimmte Isoformen von CSPG4/NG2 im Tumormilieu des GBM, wo andere Umweltbedingungen als *in vitro* vorherrschen, hochregulierend wirkt und so die EMT spezifischer Perizyten und die Tumor-Angiogenese fördert. Daher ist die ausbleibende, TGF- β -induzierte Regulation in der vorliegenden Arbeit möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die hier getestete Variante von CSPG4/NG2 nicht zu diesen bestimmten Isoformen gehörte. Im weiteren Sinne zeigten Studien, dass lediglich Perizyten zur Angiogenese rekrutiert werden, die sowohl Nestin als auch CSPG4/NG2 exprimierten. Hierfür wurden verschiedene Typen von Perizyten, die sich in der Expression von Nestin unterschieden, im Hinblick auf ihr angiogenetisches Verhalten verglichen (142). Dazu übereinstimmend zeigten weitere Studien, dass die komplette Ausschaltung von CSPG4/NG2 in Perizyten die Angiogenese hemmte (143) und lieferten damit weitere Hinweise auf die Notwendigkeit der Expression spezifischer Isoformen von CSPG4/NG2 für die Induktion einer perizytären EMT. Demzufolge würde das GBM im Rahmen der Tumor-Angiogenese nur bestimmte Typen von Perizyten rekrutieren, die entweder bestimmte, vorausgesetzte Gene bzw. Markerproteine, zu denen bestimmte Isoformen von CSPG4/NG2 gehören, bereits exprimieren oder um anschließend deren Expression zu induzieren. Unter dieser Annahme würde eine TGF- β -induzierte EMT im GBM nur in Perizyten mit bestimmtem Expressionsmuster ablaufen. Nestin, welches hierbei einen neuronalen Stammzellmarker darstellt (144, 145), war in weiteren Studien neben CSPG4/NG2 ebenfalls in extrahierten, ischämischen Perizyten exprimiert, die infolge der Kultivierung in Endothelzellmedium zu CD31-positive Endothelzellen transdifferenzierten (46). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass PDGFR- β -positive, ischämische Perizyten, die im Gegensatz zu Perizyten aus nicht-ischämischen Hirnarealen Nestin-positiv waren, den Stammzellmarker Sox2 exprimierten und daher auf keine Dedifferenzierung hinwiesen (47).

Vor diesem Hintergrund könnte eine Ursache für die fehlende, TGF- β -induzierte EMT in der vorliegenden Arbeit im Expressionsmuster der behandelten HBVPs liegen, das womöglich die Voraussetzungen für eine EMT nicht erfüllte. Welches Expressionsmuster genau vorausgesetzt wird, sollte im Rahmen weiterer Studien untersucht werden.

4.1.3 Keine Annahme von Stammzeleigenschaften der TGF- β -behandelten Perizyten bei fehlender Hochregulation der Stammzellmarker

In der vorliegenden Arbeit konnte in den HBVPs keine Expression von Sox2, Sox10, Sox17 und S100- β nachgewiesen werden. Auch die Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2 führte zu keiner signifikanten Hochregulation. Die Durchführung einer Teststatistik war für die TGF- β 2-Versuchsreihe von Sox10 und für beide TGF- β -Versuchsreihen von Sox17 zwar nicht möglich. Jedoch war hierbei ohnehin sowohl vor als auch nach der Behandlung keine Expression und somit keine Hochregulation nachweisbar. Die S100- β -Testreihe wies schwankende Ct-Werte auf, obwohl die zugehörige GAPDH-Referenzreihen eine genaue Pipettierung zeigten. Deshalb ist hierbei neben fehlender Expression von S100- β auch eine fehlende Funktionsfähigkeit der verwendeten Primer möglich. Schließlich konnte unabhängig von der Behandlung keine Expression von S100- β nachgewiesen werden. Obwohl keine Hochregulation von S100- β erkennbar war, war eine verlässliche Aussage über die Wirkung von TGF- β auf die Expression von S100- β nicht möglich. Im Gegensatz dazu konnte in den HBVPs bereits vor der Behandlung eine Expression von c-myc und Klf-4 nachgewiesen werden. Es kam hierbei zu einer signifikanten Herabregulation von c-myc durch 5 ng/ml TGF- β 1 (Abb. 13). Die statistische Effektstärke war hoch und somit hinweisend auf ein hohes und relevantes Ausmaß der Wirkung von TGF- β 1. Ebenso führte TGF- β 1 bei einer Konzentration von 5 ng/ml und 10 ng/ml zu einer signifikanten Herabregulation von Klf4 (Abb. 15). Auch hier zeigte sich eine hohe Effektstärke im Sinne eines relevanten Effekts. Auf der anderen Seite jedoch zeigte sich vor dem Hintergrund der Fragestellung weder durch TGF- β 1 noch TGF- β 2 eine signifikante Hochregulation von c-myc und Klf4, die jeweils auch als Stammzellmarker bekannt sind (95, 96).

Die Ergebnisse ergeben zusammengefasst keine Hinweise auf eine TGF- β -induzierte Annahme von Stammzellcharakteristika durch die behandelten Perizyten.

4.1.4 TGF- β -induzierte Senkung der Proliferationsrate und Hemmung der tumorfördernden Mikroumwelt durch Herabregulation von c-myc und Klf4

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von c-myc durch TGF- β 1 bei einer Konzentration von 5 ng/ml signifikant herabreguliert (Abb. 13). C-myc wird zwar einerseits

als Stammzellmarker beschrieben (95, 96), hat jedoch andererseits eine größere Funktionsvielfalt. C-myc wird u.a. mit einer Steigerung der Proliferationsrate und zellulärem Wachstum in Verbindung gebracht und stellt daher ein Proto-Onkogen dar, das in vielen tumorösen Erkrankungen hochreguliert vorliegt (101, 146, 147). Es ist bekannt, dass eine Herabregulation von c-myc, bspw. durch TGF- β , mit einer Senkung der Proliferationsrate und einem Zellzyklusarrest einhergeht (148). Daher spricht das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, übereinstimmend mit der aktuellen Literatur, dafür, dass TGF- β in den Perizyten durch Herabregulation des Proto-Onkogens c-myc anstatt zu einer Dedifferenzierung zu einem Zellzyklusarrest geführt hat (Abb. 13), da als weitere Stammzellmarker (95, 96) auch Klf4 herabreguliert (Abb. 15) und Sox2 nicht hochreguliert wurde (Abb. 1, Abb. 2). Diese Wirkung passt zu den tumorsuppressiven Eigenschaften von TGF- β (149). Die signifikante Herabregulation von Klf4 in der vorliegenden Arbeit wurde durch TGF- β 1 bei den Konzentrationen 5 ng/ml und 10 ng/ml herbeigeführt. In der TGF- β 2-Versuchsreihe kam es zwar zu keinem signifikanten Ergebnis, jedoch zu einer Senkung der Expression in einem einzigen Teilversuch, welches nicht reproduziert werden konnte. Es ist bekannt, dass Perizyten durch eine Hochregulation von Klf4 in einen weniger differenzierten Zellstatus überführt werden und daraufhin durch erhöhte Produktion von Fibronectin zur prometastatischen Mikroumwelt beitragen (150). Obwohl das GBM normalerweise nicht metastasiert (151), weist das Ergebnis der vorliegenden Arbeit statt auf eine Dedifferenzierung der Perizyten auf die bereits beschriebene, tumorsuppressive Wirkung von TGF- β hin (149), weil eine Inaktivierung von Klf4 zu einer Hemmung dieser tumorfördernden Prozesse führt (150). Weiterhin ist vor dem Hintergrund, dass eine Überexpression von Klf4 zu einer Induktion der Angiogenese führt (152), die ausgebliebene Hochregulation durch TGF- β ebenfalls ein Hinweis auf eine nicht erfolgte EMT der behandelten Perizyten.

4.1.5 Keine Transdifferenzierung der Perizyten in endotheliale Zelltypen bei fehlender Hochregulation endothelialer Zellmarker

Vor der Behandlung konnte keine Expression von CDH5, CD31 und flk-1 und keine bis allenfalls eine sehr niedrige Expression von Endoglin und TM in den untersuchten

HBVPs nachgewiesen werden. Auch die Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2 führte zu keiner signifikanten Hochregulation dieser endothelialen Zellmarker (Abb. 1 - Abb. 6).

In der TGF- β 1-Versuchsreihe der Endoglin-Testreihe ergab sich bei 1 ng/ml Behandlungskonzentration ein $p = 0,076$ nahe des Signifikanzniveaus und eine hohe Effektstärke, die zunächst vermuten lässt, dass bei höherer Versuchszahl ein statistisch signifikanter Effekt zu erwarten ist. Aufgrund des erniedrigten Mittelwerts würde man hier zunächst von einer TGF- β 1-induzierten Herabregulation bei 1 ng/ml ausgehen (Abb. 3). Da aber in den Perizyten bereits vor der Behandlung überwiegend keine Expression von Endoglin nachweisbar war, kann somit auch keine Herabregulation stattfinden. Außerdem war für die Auswirkung von TGF- β 1 bei den Konzentrationen 5 ng/ml und 10 ng/ml aufgrund der hohen Standardabweichungen keine Aussage bezüglich einer Regulation möglich. Deshalb ist hier im Kontext die Aussagekraft der gemessenen Effektstärke zu gering, um von einer relevanten Wirkung von TGF- β 1 oder von einer signifikanten Regulation durch TGF- β 1 bei höherer Versuchszahl auszugehen. Stattdessen findet laut Studien unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Hochregulation von Endoglin statt. Dabei wirkt TGF- β synergistisch und verstärkt in Wechselwirkung mit Hypoxie die Hochregulation von Endoglin signifikant, wie anhand von Endothelzellen und Monozyten gezeigt wurde (153). Die normoxischen Behandlungsbedingungen in der vorliegenden Arbeit könnten daher die Ursache der ausgebliebenen Hochregulation sein. Weil im GBM Endoglin in Zellen nachgewiesen wurde, die außerdem den perizytären Marker α -smooth muscle actin (α -SMA) exprimierten (154), ist es möglich, dass TGF- β erst unter hypoxischen Bedingungen zu einer Transdifferenzierung von Perizyten mit konsekutiver Hochregulation von Endoglin führt. Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass eine TGF- β -induzierte Aktivierung und Migration der Perizyten ohne Hochregulation von Endoglin abläuft. Das Protein namens secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), das in den astrozytären Gliomen vom Grad 2 bis 4 hochgradig exprimiert wird (155, 156) und die Invasivität des Glioms erhöht (156), fördert die Migration von Perizyten, indem es mit Endoglin in Wechselwirkung tritt und dadurch seine Interaktion mit TGF- β 1 und die perizytäre Antwort darauf hemmt. Dadurch fördert SPARC die perizytäre Rekrutierung und Migration (157). Demnach wäre hierfür eine Hochregulation von Endoglin als Teil des TGF- β -Rezeptorkomplexes (158) nicht notwendig. Zuletzt war die Versuchszahl der Behandlungsgruppe „TGF- β 2; 10 ng/ml“ der Endoglin-Testreihe für ein aussagekräftiges

Ergebnis zu niedrig, obwohl die Versuchsreihen von TGF- β 1 und - β 2 keine signifikanten Ergebnisse hervorbrachten.

Des Weiteren konnte für TM wegen zu niedriger Versuchszahl keine Teststatistik berechnet werden. Obwohl hier keine Hochregulation zu beobachten war, war aufgrund der niedrigen Versuchszahl eine aussagekräftige, statistische Angabe im Hinblick auf die Regulation durch TGF- β nicht möglich.

In der TGF- β 2-Testreihe von flk-1 zeigte sich in den behandelten Perizyten im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Abnahme der mittleren Expression bei einer Behandlungskonzentration von 1 ng/ml mit hoher, relevanter Effektstärke (Abb. 6). Abgesehen vom fehlenden Nachweis einer Expression von flk-1 in den HBVPs sowohl vor als auch nach Behandlung mit TGF- β war die Versuchszahl von $n = 2$ jedoch zu niedrig für ein aussagekräftiges Ergebnis. Auch die Behandlungszellgruppen „TGF- β 1; 1 ng/ml“ und „TGF- β 2; 5 ng/ml“ hatten wegen der zu niedrigen Versuchszahl eine unzureichende Aussagekraft (Abb. 5).

Dagegen konnte bereits in den unbehandelten Perizyten eine Expression von VCAM-1 nachgewiesen werden. Es wurde keine signifikante Hochregulation durch TGF- β beobachtet. Stattdessen kam es hierbei durch TGF- β 1 zu einer signifikanten Herabregulation bei allen Behandlungskonzentrationen (Abb. 17). Die gemessene Effektstärke war im Sinne einer relevanten Wirkung hoch.

Insgesamt ergeben die vorliegenden Ergebnisse keine Hinweise auf eine stattgehabte, TGF- β -induzierte Transdifferenzierung der behandelten Perizyten in endotheliale Zelltypen.

4.1.6 Hemmung der Einwanderung von Leukozyten ins Tumorgeschehen durch TGF- β - induzierte Herabregulation von VCAM-1

Bei VCAM-1 handelt es sich um ein glykosyliertes Transmembranprotein (119, 120), das bei inflammatorischer Zellumgebung in Endothelzellen hochreguliert wird (120, 121) und ebenfalls in proliferativen, Tumor-Angiogenese-assoziierten Perizyten nachweisbar ist (122). Funktionell ermöglicht VCAM-1 Leukozyten die Adhäsion und Transmigration durch die Endothelzellschicht aus der Blutbahn ins Gewebe (119-121). Die

Herabregulation durch TGF- β 1 in der vorliegenden Arbeit (Abb. 17) weist daher auf die antientzündliche Wirkung von TGF- β hin (159, 160), wodurch TGF- β 1 die Einwanderung von Immunzellen hemmt. Andere Studien bestätigen dieses Ergebnis und kommen zur selben Schlussfolgerung (161). Daher steht die TGF- β 1-vermittelte Herabregulation von VCAM-1 in Verbindung mit der bekannten, immunsuppressiven, tumorfördernden Wirkung von TGF- β (162, 163), da TGF- β 1 durch diesen Mechanismus ebenfalls die Einwanderung von Leukozyten ins Tumorgewebe reduzieren kann, um den Tumor vor einer Immunantwort zu schützen. Die aktuelle Literatur, nach der die Herabregulation von VCAM-1 im Tumor einen Schutzmechanismus vor einwandernden Leukozyten darstellt (119), teilt diese Schlussfolgerung.

4.1.7 Zusammengefasst keine Dedifferenzierung und Transdifferenzierung der Perizyten durch alleinige Behandlung mit TGF- β

Bis auf die signifikante, TGF- β 1-induzierte Herabregulation von CSPG4 bei einer ohnehin allenfalls nur sehr niedrigen Ausgangsexpression zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die übrigen, perizytären Zellmarker keine weiteren, signifikanten Ergebnisse im Sinne einer Herabregulation. Die Ergebnisse der RGS5-Testreihe waren nicht aussagekräftig. Bei fehlender Hochregulation sämtlicher Stammzellmarker wurde die Expression von c-myc und Klf4 durch TGF- β 1 in einem relevanten Ausmaß herabreguliert, passend zu den tumorsuppressiven Eigenschaften von TGF- β . Daher konnte keine Annahme von Stammzeleigenschaften der Perizyten infolge der Behandlung mit TGF- β 1 und - β 2 gezeigt werden. Ebenso gab es bei fehlendem Nachweis einer signifikanten Hochregulation der endothelialen Zellmarker keine Hinweise auf eine TGF- β -induzierte Transdifferenzierung der Perizyten in endotheliale Zelltypen. Stattdessen kam es in den behandelten Perizyten durch TGF- β 1 zu einer signifikanten und relevanten Herabregulation des bereits exprimierten Zellmarkers VCAM-1. Von CD31, CDH5 und flk-1 konnte in den HBVPs weder eine Expression noch eine Hochregulation nachgewiesen werden.

Allgemein geht die Induktion der Tumor-Angiogenese mit einer bestimmten Änderung des Genexpressionsmusters einher, die die Zellmigration der an der Tumor-Angiogenese beteiligten Zellen wie Endothelzellen und Perizyten markiert und mit der Aktivierung und Hochregulation des TGF- β -Signalwegs assoziiert ist. Im Gliom korreliert dieses

genetische Veränderungsmuster mit der Expression endothelialer Zellmarker, zu denen auch CD31 und CDH5 gehören (164). In der vorliegenden Arbeit konnten beide Marker in den Perizyten sowohl vor als auch nach Behandlung mit TGF- β nicht nachgewiesen werden. Hierbei spricht der fehlende Nachweis einer Expression sowie Hochregulation der getesteten, endothelialen Zellmarker in dieser Arbeit nicht nur gegen eine Transdifferenzierung der Perizyten, sondern ebenso gegen die Auslösung dieses bestimmten, genetischen Veränderungsmusters zur Auslösung der Tumor-Angiogenese. Demzufolge hat die Behandlung der HBVPs mit TGF- β 1 und - β 2, die zu einer Hochregulation des EMT-Transkriptionsfaktors SLUG führt (78), nicht ausgereicht, um in den behandelten Perizyten das oben genannte, genetische Veränderungsmuster mit konsekutiver Dedifferenzierung und anschließender EMT auszulösen. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, welche weiteren Voraussetzungen hierfür notwendig sind.

4.2 Weitere Voraussetzungen für perizytäre EMT notwendig

In der vorliegenden Arbeit hat TGF- β zu keiner Dedifferenzierung der behandelten Perizyten mit anschließender Differenzierung zu Zellen des endothelialen Zelltyps geführt. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass ischämische Perizyten Stammzeleigenschaften annehmen und unter bestimmten Umständen eine Transdifferenzierung in verschiedene Zelltypen durchlaufen können (46, 47). Zur Auslösung einer Transdifferenzierung in endotheliale bzw. neurale Zelltypen haben Nakagomi et al. ischämische Perizyten in Endothelzellmedium bzw. Neuralzellmedium kultiviert. Außerdem zeigten ischämische Perizyten neben SLUG und α -SMA auch eine Expression von SNAIL (46). Tumorgefäß-assoziierte Perizyten der von Mäder et al. als sekundäre GBM mit IDH-Mutationsstatus, WHO-Grad 4, eingestuften Hirntumore wiesen neben SLUG auch eine Expression von TWIST auf (77). Aufgrund der Expression weiterer EMT-Transkriptionsfaktoren wie SNAIL und TWIST ist also anzunehmen, dass neben einer TGF- β -induzierten Hochregulation von SLUG in Perizyten (78) weitere Voraussetzungen notwendig sind, um eine EMT auszulösen. Da aus der Literatur bekannt ist, dass EMT keine Eigenleistung einzelner Moleküle oder Vorgänge, sondern das Ergebnis des Zusammenwirkens mehrerer Interaktionen darstellt (165), werden wahrscheinlich weitere Zytokine und Signale benötigt, um in Perizyten über die Hochregulation weiterer EMT-Transkriptionsfaktoren wie

SNAIL oder TWIST und möglicherweise weiterer Signalwege eine EMT zu induzieren. Denn die hypoxische Mikroumwelt des GBM ist neben TGF- β (76) auch von vielen weiteren Zytokinen wie HIF oder VEGF geprägt (166).

4.2.1 Synergistische Interaktionen mit TGF- β zur Induktion einer EMT

Weitere Studien zeigten anhand von Proben aus cerebralen Post-Infarkt-Arealen den immunhistochemischen Nachweis einer Expression von Sox2 in ischämischen Perizyten, die sich in der Nähe von CD31-positiven Endothelzellen aufhielten (46, 47). In Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wonach die alleinige Behandlung der Perizyten mit TGF- β 1 und - β 2 unter normoxischen Bedingungen zu keiner Hochregulation von Sox2 führte, ergeben sich somit zusätzliche Hinweise auf weitere Zytokine oder Signalwege, die in Synergie mit TGF- β die Dedifferenzierung der Perizyten mit anschließender EMT in andere Zelltypen fördern. Diese Annahme wird von den Studienergebnissen von Nakagomi et al., die zu einer sehr ähnlichen Schlussfolgerung kommen, gestützt. Weil sie einen zusätzlichen Einfluss durch endotheliale Zellen auf die ischämischen Perizyten über parakrin ausgeschüttete Zytokine vermuteten, konnten sie über weitere Versuche eine Hochregulation von Sox2 in hypoxisch behandelten Perizyten durch endothelial sezernierte Faktoren nachweisen. Diese Faktoren unterstützten dadurch die Dedifferenzierung der hypoxischen Perizyten und unter zusätzlicher Behandlung in Neuralzellmedium weitergehend ihre Differenzierung in neurale Zelllinien. Bei gleichzeitiger Behandlung der Perizyten mit beiden Zytokinen führten diese zu einer stärkeren Hochregulation von Sox2 im Sinne eines synergistischen Effekts. Dabei handelte es sich um Leukemia inhibitory factor (LIF) und Fibroblast growth factor 2 (FGF2) (46), wobei es sich bei LIF um einen endothelial sezernierten Faktor handelt (167), der Sox2 induzieren kann (168), und FGF2 ebenfalls ein endothelial sezerniertes Zytokin darstellt, dessen Expression über Hypoxie induziert wird (169). Da hierbei zur Unterstützung der Dedifferenzierung der hypoxischen Perizyten die Zugabe weiterer Zytokine notwendig war, passt diese Studie zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der eine Hochregulation der getesteten Zellmarker wahrscheinlich aufgrund fehlender Weiterbehandlung nach Zugabe von TGF- β ausblieb. Die oben genannte These wird dadurch weiter untermauert, indem isolierte, ischämische Perizyten, die bereits die endothelialen Zellmarker CDH5,

Endoglin und TM exprimierten, weitere Endothelzellmarker wie flk-1 und CD31 infolge der Kultivierung in Endothelzellmedium hochregulierten (46). Da in der vorliegenden Arbeit nach der Behandlung der HBVPs mit TGF- β bei Kultivierung in Perizytenmedium keine Hochregulation der Endothelzellmarker zu beobachten war, deutet dies auf weitere, notwendige Faktoren zur Induktion der perizytären EMT hin, die die Differenzierung in endotheliale Zelltypen unterstützen, im Endothelzellmedium enthalten sind und im Perizytenmedium fehlen. Dieser Synergismus zwischen TGF- β und weiteren Wachstumsfaktoren und Signalwegen zur Induktion einer EMT wird ebenfalls in der aktuellen Literatur beleuchtet und bestätigt (170).

Zusammenfassend ist es demnach auch möglich, dass neben GBM-Zellen auch CD31-positive Endothelzellen und die hypoxische Mikroumwelt des Tumors einen Einfluss auf umgebende Perizyten ausüben, in diesen Zellen in Kooperation mit TGF- β die Hochregulation von Stammzellmarker wie Sox2 und anschließend eine Herabregulation perizytärer Zellmarker sowie die Hochregulation zellspezifischer Zellmarker im Sinne einer EMT induzieren. Letztere schließt die Hochregulation endothelialer Zellmarker als Hinweis auf eine Transdifferenzierung in endotheliale Zelltypen im Rahmen der Tumor-Angiogenese mit ein. Diese Schlussfolgerung wird bereits durch Studien von Nakagomi et al. gestützt, geteilt und bestätigt (46).

Vor diesem Hintergrund sollte neben dem Einfluss von GBM-Zellen auch derjenige weiterer Faktoren der Mikroumwelt des GBM in Interaktion mit TGF- β auf das Differenzierungsverhalten der GBM-assoziierten Perizyten untersucht werden. Der Fokus sollte dabei auf Faktoren gelegt werden, die unter hypoxischen Umweltbedingungen von GBM-Zellen und weiteren Zellen wie Tumorgefäß-assoziierten Endothelzellen sezerniert und aktiviert werden.

4.2.1.1 Synergistische Interaktionen endothelialer Einflüsse mit TGF- β zur Induktion der perizytären EMT

Nakagomi et al. konnten durch Studien eine Hochregulation von Sox2 in hypoxisch behandelten Perizyten durch die zusätzliche Behandlung mittels der endothelial sezernierten Faktoren LIF und FGF2 nachweisen. Damit bestätigten sie ihre Annahme, dass endothelial sezernierte Faktoren in hypoxischen Perizyten zur Annahme von

Stammzellcharakteristika mitwirken (46). Unter diesem Gesichtspunkt ist es wahrscheinlich, dass GBM-assoziierte Endothelzellen rekrutierte, umgebende Perizyten durch parakrine Mechanismen beeinflussen und synergistisch zu den hypoxischen Umweltbedingungen und zur TGF- β -Signaltransduktion zur Dedifferenzierung der Perizyten beitragen.

Vor diesem Hintergrund liegen Studien vor, die mittels RNA-Sequenzierung das Transkriptom von allein kultivierten Perizyten dem von Perizyten in gemeinsamer Kultivierung mit Endothelzellen gegenüberstellten und miteinander verglichen. Die gemeinsam kultivierten Perizyten wiesen Unterschiede in der Transkription von über 6000 Genen auf, die mit der Zellreifung, der Proliferation und der morphologischen Entwicklung assoziiert waren und durch parakrine Signale der Endothelzellen zustande kamen. Hierbei zeigte sich eine Hochregulation von c-myc, CSPG4/NG2, CD146 und Nestin und eine Herabregulation von PDGFR- β und der Produktion von Fibronektin (171). Eine Hochregulation von CSPG4/NG2 und Nestin findet sich dabei auch in isolierten, ischämischen Perizyten mit dem Potenzial zur De- und Transdifferenzierung in endotheliale Zelltypen (46). Ergänzend dazu könnte die Herabregulation von PDGFR- β ein Hinweis auf eine Dedifferenzierung mit beginnender Transdifferenzierung der Perizyten sein, weil ischämische Perizyten, die in Neuralzellmedium kultiviert wurden, vor Annahme von Stammzeleigenschaften durch Hochregulation von Sox2 mit anschließender Differenzierung in neurale Zelltypen ebenfalls eine Herabregulation von PDGFR- β zeigten (46). Daher sind diese Veränderungen in den mit Endothelzellen gemeinsam kultivierten Perizyten als Hinweise auf Prozesse der Dedifferenzierung und Transdifferenzierung zu deuten. Die Hochregulation des Proto-Onkogens c-myc ist dagegen ein Zeichen für eine erhöhte Proliferationsrate (101, 146, 147), die mittels eines Vergleichs mit den allein kultivierten Perizyten erkennbar war (171). Da c-myc über Bindung an den Sox2-Promoter die zelluläre Dedifferenzierung fördern kann (172, 173), spricht eine Hochregulation von c-myc passend zur Regulationsdynamik der anderen Zellmarker für eine stattfindende Dedifferenzierung der Perizyten. Die endothelial induzierte Hemmung der Produktion von Fibronektin könnte auf eine Herabregulation von Klf4 hindeuten, da umgekehrt eine erhöhte Klf4-Expression mit erhöhter Produktion von Fibronektin einhergeht (150). Dies könnte mit der Wirkung von TGF- β zusammenhängen, dem auch nach Ergebnissen von Brandt et al. im Hinblick auf die bereits oben genannten, endothelial induzierten Transkriptionsregulationen in den

Perizyten eine tragende Rolle zukommt (171). Im Einklang dazu stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die eine signifikante Herabregulation von Klf4 durch TGF- β 1 bei den Konzentrationen 5ng/ml und 10ng/ml zeigten (Abb. 15). Dabei zeigte sich TGF- β 1 als aktivstes Zytokin in den mit Endothelzellen gemeinsam kultivierten Perizyten in Bezug auf die zwischenzellulär bedingten Veränderungen. Perizyten in engem Kontakt zu Endothelzellen wiesen eine deutlich höhere Aktivität der TGF- β -Signaltransduktion auf (171).

Somit haben zu den Veränderungen im Transkriptom der gemeinsam kultivierten Perizyten sowohl parakrine Einflüsse von Endothelzellen als auch TGF- β beigetragen. Dieser synergistische Einfluss führte zu Veränderungen, die auf eine Dedifferenzierung mit anschließender, beginnender Transdifferenzierung hinweisen. Die alleinige Behandlung der Perizyten in der vorliegenden Arbeit unter normoxischen Bedingungen und ohne gemeinsame Kultivierung mit Endothelzellen war vor diesem Hintergrund wahrscheinlich die Ursache für die ausgebliebene Dedifferenzierung und Transdifferenzierung in endotheliale Zelltypen. Demzufolge sind zusammengefasst neben TGF- β höchstwahrscheinlich weitere Einflüsse zur Auslösung einer perizytären EMT erforderlich.

4.2.1.2 Synergistische Induktion von EMT-Vorgängen durch Hypoxie mit TGF- β

Da ischämische Perizyten, die aus cerebralen Infarktarealen isoliert wurden, Stammzell-eigenschaften annehmen und eine Transdifferenzierung in andere Zelltypen durchlaufen können (46, 47) und im GBM unter hypoxischen Bedingungen hohe Konzentrationen an TGF- β sezerniert werden (76), wirken Hypoxie und TGF- β bei der Induktion einer perizytären EMT im GBM möglicherweise synergistisch. Es ist bekannt, dass zur Induktion einer EMT unter Hypoxie HIF-1 α in Synergie mit TGF- β die Expression von SNAIL in Hepatozyten (174) oder auch synergistisch mit Glukosemangel neben SNAIL zusätzlich die Expression der EMT-assoziierten Proteine SLUG und N-Cadherin in HCC-Zellen erhöht (175), wobei HIF-1 α einen Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor darstellt (54, 55). Als weiteres Beispiel für einen Synergismus ist die TGF- β -induzierte Hochregulation von Endoglin in Monozyten und Endothelzellen heranzuziehen, die ebenso durch hypoxische Umweltbedingungen in der zellulären Mikroumwelt verstärkt wird (153), wobei Endoglin einen endothelialen Zellmarker darstellt (116). In der Gesamtschau wird hierbei

deutlich, dass hypoxische Umweltbedingungen nicht nur in der Lage sind, eine EMT zu induzieren (51), sondern in synergistischer Interaktion mit TGF- β zu einer Verstärkung dieser Induktion führt. Diese These wird durch andere Studien weiter untermauert, die Perizyten unter Sauerstoff- und Glukoseentzug zur Simulation hypoxischer Bedingungen kultivierten und anschließend auf Zellmarker untersuchten. Die Behandlung führte anschließend zu einer Herabregulation perizytärer Zellmarker als Zeichen einer Dedifferenzierung und einer Hochregulation des Stammzellmarkers Sox2 (47). Eine zusätzliche Behandlung mit TGF- β könnte diesen Prozess beschleunigen und synergistisch zu einer EMT führen.

Da hypoxische Bedingungen regelhaft im GBM vorkommen (29, 30), wo EMT-Vorgänge eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielen (51), sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, nach denen die Behandlung mit TGF- β allein nicht zu einer Dedifferenzierung der Perizyten mit anschließender EMT in endotheliale Zelltypen geführt hat, dafür, dass neben TGF- β zusätzlich auch hypoxische Bedingungen und damit verbunden HIF-1 α und Glukosemangel als Auslöser notwendig sind, um neben TGF- β -induzierter Expression von SLUG (78) über die Hochregulation weiterer, additiv wirkender EMT-Transkriptionsfaktoren wie SNAIL eine EMT zu induzieren.

4.2.1.3 Weitere EMT-induzierende Signalwege in Interaktion mit TGF- β

Laut aktuellen Studien existieren eine Vielzahl von Signalwegen, die in Kooperation mit dem TGF- β -Signalweg die EMT induzieren (170). Dazu gehört u.a. der komplexe Wingless / Integrated (WNT-) Signalweg, der in der Entwicklung des ZNS eine Rolle spielt (176-178) und zur Hochregulation von SLUG, SNAIL und TWIST führt (170, 176, 179, 180). Durch Hemmung des WNT-Signalwegs lässt sich die TGF- β -induzierte EMT hemmen (181). Ein weiterer Signalweg, der in die Regulierung der Proliferationsrate und Differenzierung eingebunden ist und in Tumorerkrankungen häufig eine Rolle spielt, ist die Proteinfamilie des rat sarcoma (RAS-) Systems (182-184). Dieses stellt einen weiteren, synergistischen Partner in der TGF- β -vermittelten Induktion der EMT dar, leitet in Kooperation mit dem TGF- β -Signalweg die Induktion des EMT-Faktors SNAIL ein und verstärkt ihn zusätzlich (185, 186). Die TGF- β -induzierte Expression von SNAIL ist hochgradig abhängig vom RAS-System, sodass die Inhibition der RAS-Signale eine

Hemmung der SNAIL-Expression zur Folge hat (185). Ob diese Signalwege, die synergistisch mit der TGF- β -induzierten Signaltransduktion zur Auslösung der EMT kooperieren, auch bei der Induktion einer EMT in Perizyten eine Rolle spielen, ist noch in weiteren Studien herauszufinden.

4.3 Schlussfolgerung

Die Behandlung der Perizyten mit TGF- β 1 und TGF- β 2 hatte keine signifikante Herabregulation perizytärer Zellmarker und keine Hochregulation von Stammzellmarkern im Sinne einer TGF- β -induzierten Dedifferenzierung der Perizyten mit darauffolgender Annahme von Stammzeleigenschaften zur Folge. Auch die endothelialen Zellmarker zeigten keine Hochregulation infolge der Behandlung mit TGF- β . Die Hypothese, dass TGF- β zu einer Dedifferenzierung mit anschließender EMT der Perizyten führt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Stattdessen ist davon auszugehen, dass TGF- β als alleiniger Auslöser zu keiner Dedifferenzierung mit konsekutiver EMT in Perizyten führt.

Weil ischämische Perizyten aus einem Postinfarktareal sämtliche Hinweise auf Vorgänge der Dedifferenzierung, der Annahme von Stammzeleigenschaften und der Transdifferenzierung zeigten (46) und die Mikroumwelt des GBM neben hohen Konzentrationen an TGF- β (76) auch von Hypoxie geprägt ist (29, 30), ist davon auszugehen, dass zusätzlich zur TGF- β -induzierten Hochregulation von SLUG (78) weitere, Hypoxie-assoziierte Zytokine und Signalwege für die Induktion notwendig sind. Weitere Akteure, die für eine synergistische Wechselwirkung infrage kommen, sind die Tumor-assoziierten Endothelzellen, die über parakrine Einflüsse das Transkriptom der Perizyten beeinflussen und die perizytäre Antwort auf die TGF- β -Signaltransduktion verstärken (171). Darüber hinaus existieren eine Reihe weiterer Signalwege, die in Kooperation mit dem TGF- β -Signalweg die EMT fördern (170) und deren Einfluss auf die TGF- β -induzierte Dedifferenzierung mit anschließender Transdifferenzierung der Perizyten zu untersuchen ist.

Zur weiteren Aufklärung des endothelialen Einflusses im Rahmen einer synergistischen Interaktion mit TGF- β zur Induktion der perizytären Dedifferenzierung und Transdifferenzierung sollten Perizyten gemeinsam mit Endothelzellen kultiviert, anschließend mit TGF- β sowie TGF- β -Antikörper behandelt und schließlich jeweils mit einer

unbehandelten Kontrollgruppe allein sowie gemeinsam mit Endothelzellen kultivierter Perizyten verglichen werden. Zur Untersuchung der Interaktion zwischen hypoxischen Umweltbedingungen und der TGF- β -Signaltransduktion kann das Studiendesign der vorliegenden Arbeit unter Ergänzung durch hypoxische und normoxische Kultivierungsbedingungen als zusätzliche Variable ergänzt werden.

5 Zusammenfassung

Das GBM ist der häufigste, maligne Hirntumor und ist aufgrund seiner vielfältigen Eigenschaften von einer schlechten Prognose gekennzeichnet. Die ausgeprägte Vaskularisation des GBM stellt auf der Suche nach therapeutischen Zielstrukturen des GBM einen Forschungsschwerpunkt dar. Die GBM-assoziierten Gefäße erscheinen im Vergleich zu physiologischen Gefäßen stark deformiert und sind u.a. der Grund für die erschwerte Therapierbarkeit. Als Teil der Blut-Hirn-Schranke spielen hierbei die Perizyten eine wichtige Rolle. Unter hypoxischen Umweltbedingungen, die im GBM regelhaft vorkommen, können Perizyten Stammzeleigenschaften annehmen und unter bestimmten Bedingungen in verschiedene Zelltypen transdifferenzieren. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Perizyten auf ihr Potenzial untersucht, im GBM mittels EMT zur Tumor-Angiogenese beizutragen. Dabei stellte sich die Frage, ob Perizyten durch TGF β eine Dedifferenzierung mit konsekutiver Transdifferenzierung in endotheliale Zelltypen im Sinne einer EMT durchlaufen. Hierfür wurden Perizyten achtzehn Stunden lang jeweils mit TGF- β 1 und TGF- β 2 behandelt und anschließend über das qPCR-Verfahren auf Veränderungen der Genexpression untersucht. Dazu wurden verschiedene, perizytäre Zellmarker, Stammzellmarker und endotheliale Zellmarker herangezogen. Infolge der Behandlung zeigte sich jedoch weder eine Dedifferenzierung noch eine Transdifferenzierung der Perizyten im Sinne einer TGF- β -induzierten EMT. Da im GBM neben hohen Konzentrationen an TGF β auch hypoxische Umweltbedingungen vorkommen und in aktuellen Studien anhand ischämischer Perizyten Hinweise auf die Dedifferenzierung und Transdifferenzierung von Perizyten in verschiedene Zelltypen gefunden wurden, wird die TGF- β -induzierte EMT wahrscheinlich in Synergie mit weiteren EMT-Faktoren ausgelöst. Dazu kommen v.a. neben hypoxischen Umweltbedingungen auch Einflüsse Tumor-assoziiertes Endothelzellen über parakrine Mechanismen infrage. Um diese synergistischen Interaktionen zwischen TGF- β , Tumor-assoziierten Endothelzellen und hypoxischen Umweltbedingungen im Hinblick auf die Induktion der perizytären EMT weiter zu untersuchen, sollten Perizyten einerseits gemeinsam mit Endothelzellen und andererseits unter hypoxischen Umweltbedingungen kultiviert und jeweils mit TGF- β behandelt und analysiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro Oncol.* 2021;23(12 Suppl 2):iii1-iii105.
2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-51.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
4. Silantyev AS, Falzone L, Libra M, Gurina OI, Kardashova KS, Nikolouzakis TK, et al. Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells.* 2019;8(8).
5. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama.* 2013;310(17):1842-50.
6. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(6):479-89.
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
8. Tan AC, Ashley DM, López GY, Malinzak M, Friedman HS, Khasraw M. Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(4):299-312.
9. Brzozowska A, Toruń A, Mazurkiewicz M. The impact of surgery on the efficacy of adjuvant therapy in glioblastoma multiforme. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24(2):279-87.
10. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg D, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *Jama.* 2017;318(23):2306-16.
11. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
12. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170(5):1445-53.
13. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for "Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol.* 2018;136(5):805-10.
14. Tesileanu CMS, Dirven L, Wijnenga MMJ, Koekkoek JAF, Vincent A, Dubbink HJ, et al. Survival of diffuse astrocytic glioma, IDH1/2 wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV: a confirmation of the cIMPACT-NOW criteria. *Neuro Oncol.* 2020;22(4):515-23.
15. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol.* 2020;30(4):844-56.

16. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892-9.
17. Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist.* 2002;7 Suppl 4:31-9.
18. Huse JT. A promising preclinical model for TERT promoter mutation in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2022;24(12):2076-7.
19. Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2020;57(5):2461-78.
20. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-64.
21. Fan TP, Jaggar R, Bicknell R. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(2):57-66.
22. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267(16):10931-4.
23. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;9(3):171-4.
24. Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncol Lett.* 2018;16(1):687-702.
25. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia.* 2007;21(1):44-52.
26. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature.* 1985;315(6015):115-22.
27. Kandel J, Bossy-Wetzell E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell.* 1991;66(6):1095-104.
28. Swanson KR, Bridge C, Murray JD, Alvord EC, Jr. Virtual and real brain tumors: using mathematical modeling to quantify glioma growth and invasion. *J Neurol Sci.* 2003;216(1):1-10.
29. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006;65(6):529-39.
30. Plate KH, Mennel HD. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Exp Toxicol Pathol.* 1995;47(2-3):89-94.
31. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res.* 2004;64(3):920-7.
32. Levitan N, Dowlati A, Remick SC, Tahsildar HI, Sivinski LD, Beyth R, et al. Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. *Medicine (Baltimore).* 1999;78(5):285-91.
33. Brandes AA, Scelzi E, Salmistraro G, Ermani M, Carollo C, Berti F, et al. Incidence of risk of thromboembolism during treatment high-grade gliomas: a prospective study. *Eur J Cancer.* 1997;33(10):1592-6.

34. Valk PE, Mathis CA, Prados MD, Gilbert JC, Budinger TF. Hypoxia in human gliomas: demonstration by PET with fluorine-18-fluoromisonidazole. *J Nucl Med.* 1992;33(12):2133-7.
35. Zhu XP, Li KL, Kamaly-Asl ID, Checkley DR, Tessier JJ, Waterton JC, et al. Quantification of endothelial permeability, leakage space, and blood volume in brain tumors using combined T1 and T2* contrast-enhanced dynamic MR imaging. *J Magn Reson Imaging.* 2000;11(6):575-85.
36. Henson JW, Gaviani P, Gonzalez RG. MRI in treatment of adult gliomas. *Lancet Oncol.* 2005;6(3):167-75.
37. Dinda AK, Sarkar C, Roy S, Kharbanda K, Mathur M, Khosla AK, et al. A transmission and scanning electron microscopic study of tumoral and peritumoral microblood vessels in human gliomas. *J Neurooncol.* 1993;16(2):149-58.
38. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007;28(1):5-11.
39. Langen UH, Ayloo S, Gu C. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2019;35:591-613.
40. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 1967;34(1):207-17.
41. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010;468(7323):557-61.
42. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010;468(7323):562-6.
43. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell.* 2015;163(5):1064-78.
44. Frank RN, Turczyn TJ, Das A. Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(6):999-1007.
45. Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, et al. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature.* 2014;509(7501):507-11.
46. Nakagomi T, Kubo S, Nakano-Doi A, Sakuma R, Lu S, Narita A, et al. Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells.* 2015;33(6):1962-74.
47. Sakuma R, Kawahara M, Nakano-Doi A, Takahashi A, Tanaka Y, Narita A, et al. Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):57.
48. Caspani EM, Crossley PH, Redondo-Garcia C, Martinez S. Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. *PLoS One.* 2014;9(7):e101402.
49. Svensson A, Özen I, Genové G, Paul G, Bengzon J. Endogenous brain pericytes are widely activated and contribute to mouse glioma microvasculature. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123553.
50. Ochs K, Sahm F, Opitz CA, Lanz TV, Oezen I, Couraud PO, et al. Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. *J Neuroimmunol.* 2013;265(1-2):106-16.
51. Iwadate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett.* 2016;11(3):1615-20.

52. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.
53. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1429-37.
54. Löfstedt T, Fredlund E, Holmquist-Mengelbier L, Pietras A, Ovenberger M, Poellinger L, et al. Hypoxia inducible factor-2alpha in cancer. *Cell Cycle.* 2007;6(8):919-26.
55. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-32.
56. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell.* 2008;13(3):206-20.
57. Mondal S, Adhikari N, Banerjee S, Amin SA, Jha T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem.* 2020;194:112260.
58. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-5.
59. Ye XZ, Xu SL, Xin YH, Yu SC, Ping YF, Chen L, et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *J Immunol.* 2012;189(1):444-53.
60. Song J. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell Res.* 2007;17(4):289-90.
61. Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Song J. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene.* 2006;25(55):7235-44.
62. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
63. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30(3):293-8.
64. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 2002;296(5573):1646-7.
65. Wang Q, Xiong F, Wu G, Wang D, Liu W, Chen J, et al. SMAD Proteins in TGF- β Signalling Pathway in Cancer: Regulatory Mechanisms and Clinical Applications. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(17).
66. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(1):46-53.
67. Weller M, Fontana A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995;21(2):128-51.
68. Wick W, Naumann U, Weller M. Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr Pharm Des.* 2006;12(3):341-9.
69. Weller M, Constam DB, Malipiero U, Fontana A. Transforming growth factor-beta 2 induces apoptosis of murine T cell clones without down-regulating bcl-2 mRNA expression. *Eur J Immunol.* 1994;24(6):1293-300.
70. Sad S, Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol.* 1994;153(8):3514-22.

71. Swain SL, Huston G, Tonkonogy S, Weinberg A. Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype. *J Immunol.* 1991;147(9):2991-3000.
72. Hoehn P, Goedert S, Germann T, Koelsch S, Jin S, Palm N, et al. Opposing effects of TGF-beta 2 on the Th1 cell development of naive CD4+ T cells isolated from different mouse strains. *J Immunol.* 1995;155(8):3788-93.
73. Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, et al. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J Immunol.* 1998;161(9):4709-18.
74. Ranges GE, Figari IS, Espevik T, Palladino MA, Jr. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1987;166(4):991-8.
75. Fabry Z, Topham DJ, Fee D, Herlein J, Carlino JA, Hart MN, et al. TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *J Immunol.* 1995;155(1):325-32.
76. Kjellman C, Olofsson SP, Hansson O, Von Schantz T, Lindvall M, Nilsson I, et al. Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. *Int J Cancer.* 2000;89(3):251-8.
77. Mäder L, Blank AE, Capper D, Jansong J, Baumgarten P, Wirsik NM, et al. Pericytes/vessel-associated mural cells (VAMCs) are the major source of key epithelial-mesenchymal transition (EMT) factors SLUG and TWIST in human glioma. *Oncotarget.* 2018;9(35):24041-53.
78. Wirsik NM, Ehlers J, Mäder L, Ilina EI, Blank AE, Grote A, et al. TGF- β activates pericytes via induction of the epithelial-to-mesenchymal transition protein SLUG in glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2021;47(6):768-80.
79. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997;277(5323):242-5.
80. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999;126(14):3047-55.
81. Xu G, Li JY. Differential expression of PDGFRB and EGFR in microvascular proliferation in glioblastoma. *Tumour Biol.* 2016;37(8):10577-86.
82. Rolih V, Barutello G, Iussich S, De Maria R, Quaglino E, Buracco P, et al. CSPG4: a prototype oncoantigen for translational immunotherapy studies. *J Transl Med.* 2017;15(1):151.
83. Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn.* 2001;222(2):218-27.
84. Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiters DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol.* 1990;136(6):1393-405.
85. Stallcup WB. The NG2 Proteoglycan in Pericyte Biology. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1109:5-19.

86. Kucharova K, Stallcup WB. NG2-proteoglycan-dependent contributions of oligodendrocyte progenitors and myeloid cells to myelin damage and repair. *J Neuroinflammation*. 2015;12:161.
87. Virgintino D, Girolamo F, Errede M, Capobianco C, Robertson D, Stallcup WB, et al. An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis. *Angiogenesis*. 2007;10(1):35-45.
88. MacFadyen JR, Haworth O, Roberston D, Hardie D, Webster MT, Morris HR, et al. Endosialin (TEM1, CD248) is a marker of stromal fibroblasts and is not selectively expressed on tumour endothelium. *FEBS Lett*. 2005;579(12):2569-75.
89. Schiffer D, Mellai M, Boldorini R, Bisogno I, Grifoni S, Corona C, et al. The Significance of Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) in Human Gliomas. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
90. Mellai M, Annovazzi L, Bisogno I, Corona C, Crociara P, Iulini B, et al. Chondroitin Sulphate Proteoglycan 4 (NG2/CSPG4) Localization in Low- and High-Grade Gliomas. *Cells*. 2020;9(6).
91. Berger M, Bergers G, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood*. 2005;105(3):1094-101.
92. Bondjers C, Kalén M, Hellström M, Scheidl SJ, Abramsson A, Renner O, et al. Transcription profiling of platelet-derived growth factor-B-deficient mouse embryos identifies RGS5 as a novel marker for pericytes and vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*. 2003;162(3):721-9.
93. Cho H, Kozasa T, Bondjers C, Betsholtz C, Kehrl JH. Pericyte-specific expression of Rgs5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation. *Faseb j*. 2003;17(3):440-2.
94. Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, et al. CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(36):E7622-e31.
95. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
96. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
97. Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. SOX2 in development and cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2020;67(Pt 1):74-82.
98. Sakuma R, Kobayashi M, Kobashi R, Onishi M, Maeda M, Kataoka Y, et al. Brain Pericytes Acquire Stemness via the Nrf2-Dependent Antioxidant System. *Stem Cells*. 2022;40(7):641-54.
99. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*. 2017;611:27-37.
100. Amati B, Frank SR, Donjerkovic D, Taubert S. Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1471(3):M135-45.
101. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012;149(1):22-35.

102. Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci.* 1998;18(1):237-50.
103. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* 2001;15(1):66-78.
104. Simon C, Lickert H, Götz M, Dimou L. Sox10-iCreERT2 : a mouse line to inducibly trace the neural crest and oligodendrocyte lineage. *Genesis.* 2012;50(6):506-15.
105. Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, et al. Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development.* 2002;129(10):2367-79.
106. Matsui T, Kanai-Azuma M, Hara K, Matoba S, Hiramatsu R, Kawakami H, et al. Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 17):3513-26.
107. Yang H, Lee S, Lee S, Kim K, Yang Y, Kim JH, et al. Sox17 promotes tumor angiogenesis and destabilizes tumor vessels in mice. *J Clin Invest.* 2013;123(1):418-31.
108. Du J, Yi M, Zhou F, He W, Yang A, Qiu M, et al. S100B is selectively expressed by gray matter protoplasmic astrocytes and myelinating oligodendrocytes in the developing CNS. *Mol Brain.* 2021;14(1):154.
109. Isobe T, Takahashi K, Okuyama T. S100a0 (alpha alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. *J Neurochem.* 1984;43(5):1494-6.
110. Cinti S, Cigolini M, Morroni M, Zingaretti MC. S-100 protein in white preadipocytes: an immunoelectronmicroscopic study. *Anat Rec.* 1989;224(4):466-72.
111. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnürch H, Gotsch U, et al. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood.* 1996;87(2):630-41.
112. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, et al. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 1992;118(6):1511-22.
113. Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, et al. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(8):1229-39.
114. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1990;265(15):8361-4.
115. Derynck R, Feng XH. TGF-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1333(2):F105-50.
116. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, et al. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer.* 1999;81(4):568-72.
117. Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol.* 1985;101(2):363-71.
118. Giri H, Panicker SR, Cai X, Biswas I, Weiler H, Rezaie AR. Thrombomodulin is essential for maintaining quiescence in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(11).

119. Schlesinger M, Bendas G. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)--an increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. *Int J Cancer*. 2015;136(11):2504-14.
120. Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowkyj S, Chi-Rosso G, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 1989;59(6):1203-11.
121. Taooka Y, Chen J, Yednock T, Sheppard D. The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol*. 1999;145(2):413-20.
122. Garmy-Susini B, Jin H, Zhu Y, Sung RJ, Hwang R, Varner J. Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *J Clin Invest*. 2005;115(6):1542-51.
123. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(20):9026-30.
124. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72(6):835-46.
125. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*. 1993;118(2):489-98.
126. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62-6.
127. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 1993;53(23):5822-7.
128. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*. 1994;367(6463):576-9.
129. Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol*. 2002;72(3):221-9.
130. Scholz D, Schaper J. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells. *Cell Tissue Res*. 1997;290(3):623-31.
131. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma*. 1995;17(3-4):229-44.
132. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016;23(3):253-9.
133. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. 1997;151(3):671-7.
134. Zhou Z, Christofidou-Solomidou M, Garlanda C, DeLisser HM. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis*. 1999;3(2):181-8.

135. Blanca MJ, Alarcón R, Arnau J, Bono R, Bendayan R. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*. 2017;29(4):552-7.
136. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* Revised edition. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates; 1987.
137. Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*. 2012;120(11):2330-9.
138. Zheng C, Qiu Y, Zeng Q, Zhang Y, Lu D, Yang D, et al. Endothelial CD146 is required for in vitro tumor-induced angiogenesis: the role of a disulfide bond in signaling and dimerization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(11):2163-72.
139. Nisancioglu MH, Mahoney WM, Jr., Kimmel DD, Schwartz SM, Betsholtz C, Genové G. Generation and characterization of rgs5 mutant mice. *Mol Cell Biol*. 2008;28(7):2324-31.
140. Wang J, Svendsen A, Kmiecik J, Immervoll H, Skaftnesmo KO, Planagumà J, et al. Targeting the NG2/CSPG4 proteoglycan retards tumour growth and angiogenesis in preclinical models of GBM and melanoma. *PLoS One*. 2011;6(7):e23062.
141. Girolamo F, Dallatomasina A, Rizzi M, Errede M, Wälchli T, Mucignat MT, et al. Diversified expression of NG2/CSPG4 isoforms in glioblastoma and human foetal brain identifies pericyte subsets. *PLoS One*. 2013;8(12):e84883.
142. Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Olson JD, Mintz A, et al. Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;307(1):C25-38.
143. Ozerdem U, Stallcup WB. Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis*. 2004;7(3):269-76.
144. Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G. Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol*. 2004;469(3):311-24.
145. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):585-95.
146. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):253-64.
147. Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM, Felsher DW. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(1):23-36.
148. Orian A, Eisenman RN. TGF-beta flips the Myc switch. *Sci STKE*. 2001;2001(88):pe1.
149. Seoane J, Gomis RR. TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(12).
150. Murgai M, Ju W, Eason M, Kline J, Beury DW, Kaczanowska S, et al. KLF4-dependent perivascular cell plasticity mediates pre-metastatic niche formation and metastasis. *Nat Med*. 2017;23(10):1176-90.
151. Lah TT, Novak M, Breznik B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:262-73.
152. Hale AT, Tian H, Anih E, Recio FO, 3rd, Shatat MA, Johnson T, et al. Endothelial Kruppel-like factor 4 regulates angiogenesis and the Notch signaling pathway. *J Biol Chem*. 2014;289(17):12016-28.

153. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43799-808.
154. Burghardt I, Ventura E, Weiss T, Schroeder JJ, Seystahl K, Zielasek C, et al. Endoglin and TGF- β signaling in glioblastoma. *Cell Tissue Res.* 2021;384(3):613-24.
155. Rempel SA, Golembieski WA, Ge S, Lemke N, Elisevich K, Mikkelsen T, et al. SPARC: a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998;57(12):1112-21.
156. Schultz C, Lemke N, Ge S, Golembieski WA, Rempel SA. Secreted protein acidic and rich in cysteine promotes glioma invasion and delays tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2002;62(21):6270-7.
157. Rivera LB, Brekken RA. SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF- β 1 activity. *J Cell Biol.* 2011;193(7):1305-19.
158. Meurer SK, Weiskirchen R. Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
159. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010;31(6):220-7.
160. Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:51-82.
161. Rustenhoven J, Aalderink M, Scotter EL, Oldfield RL, Bergin PS, Mee EW, et al. TGF-beta1 regulates human brain pericyte inflammatory processes involved in neurovasculature function. *J Neuroinflammation.* 2016;13:37.
162. Derynck R, Turley SJ, Akhurst RJ. TGF β biology in cancer progression and immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(1):9-34.
163. de Streel G, Lucas S. Targeting immunosuppression by TGF- β 1 for cancer immunotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2021;192:114697.
164. Langlois B, Saupe F, Rupp T, Arnold C, van der Heyden M, Orend G, et al. AngioMatrix, a signature of the tumor angiogenic switch-specific matrisome, correlates with poor prognosis for glioma and colorectal cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5(21):10529-45.
165. Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2018;182:80-94.
166. Das S, Marsden PA. Angiogenesis in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1561-3.
167. Kubota Y, Hirashima M, Kishi K, Stewart CL, Suda T. Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2393-403.
168. Cimadamore F, Fishwick K, Giusto E, Gnedeva K, Cattarossi G, Miller A, et al. Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis. *Cell Stem Cell.* 2011;8(5):538-51.
169. Luo J, Qiao F, Yin X. Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and their invasiveness in a cocultured model. *J Reprod Dev.* 2011;57(1):84-91.

170. Saitoh M. Epithelial-Mesenchymal Transition by Synergy between Transforming Growth Factor- β and Growth Factors in Cancer Progression. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(9).
171. Brandt MM, van Dijk CGM, Maringanti R, Chrifi I, Kramann R, Verhaar MC, et al. Transcriptome analysis reveals microvascular endothelial cell-dependent pericyte differentiation. *Sci Rep*. 2019;9(1):15586.
172. Tang Q, Chen J, Di Z, Yuan W, Zhou Z, Liu Z, et al. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/ β -catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):232.
173. Kwan KY, Shen J, Corey DP. C-MYC transcriptionally amplifies SOX2 target genes to regulate self-renewal in multipotent otic progenitor cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4(1):47-60.
174. Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int*. 2010;30(5):669-82.
175. Jo H, Lee J, Jeon J, Kim SY, Chung JI, Ko HY, et al. The critical role of glucose deprivation in epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma under hypoxia. *Sci Rep*. 2020;10(1):1538.
176. Latour M, Her NG, Kesari S, Nurmammedov E. WNT Signaling as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16).
177. Kalani MY, Cheshier SH, Cord BJ, Bababeygy SR, Vogel H, Weissman IL, et al. Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):16970-5.
178. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res*. 2008;18(5):523-7.
179. Katsuno Y, Derynck R. Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- β family. *Dev Cell*. 2021;56(6):726-46.
180. Kahlert UD, Maciaczyk D, Doostkam S, Orr BA, Simons B, Bogiel T, et al. Activation of canonical WNT/ β -catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett*. 2012;325(1):42-53.
181. Han J, Shen X, Zhang Y, Wang S, Zhou L. Astragaloside IV suppresses transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ β -catenin pathway in glioma U251 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2020;84(7):1345-52.
182. Prior IA, Hood FE, Hartley JL. The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res*. 2020;80(14):2969-74.
183. Longo DL, Rosen N. Targeting Oncogenic RAS Protein. *N Engl J Med*. 2022;387(2):184-6.
184. Bar-Sagi D. A Ras by any other name. *Mol Cell Biol*. 2001;21(5):1441-3.
185. Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M. Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 2009;284(1):245-53.
186. Su J, Morgani SM, David CJ, Wang Q, Er EE, Huang YH, et al. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1. *Nature*. 2020;577(7791):566-71.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Ulrike Naumann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrike Naumann.

Nach Einarbeitung durch Prof. Dr. Ulrike Naumann und Frau Dr. Sonja Schötterl wurden sämtliche Versuche von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Ulrike Naumann für die Unterstützung, Betreuung und Beratung bedanken. Außerdem gilt mein Dank Dr. Sonja Schötterl für die kompetente Einarbeitung.

Für die Aufnahme als Stipendiat sowie die ideelle und finanzielle Unterstützung im Rahmen des Stipendiums bedanke ich mich herzlich beim IZKF-Promotionskolleg (bzw. beim interdisziplinären Promotionskolleg) der Medizinischen Fakultät Tübingen.

Ich danke allen Beteiligten für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung durchführen zu können.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei meinen Freunden und Bekannten für die Unterstützung der letzten Jahre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und meinen Brüdern, die mich auf meinem Weg bis hierher immer begleitet und unterstützt haben. Danke für alles.